



“SENSIBILIZACIÓN A COCAÍNA INDUCIDA POR ESTRÉS:
ESTUDIO DE LA HOMEOSTASIS DEL SISTEMA
GLUTAMATÉRGICO Y SU INTERACCIÓN CON EL SISTEMA
DOPAMINÉRGICO EN NÚCLEO ACCUMBENS”

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Licenciada en Bioquímica Clínica Constanza García Keller

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Farmacología

IFEC-CONICET

Argentina

Mayo 2014

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Cancela Liliana M.

MIEMBROS DE LA COMISIÓN DE TESIS

Dra. Virgolini Miriam

Dr. Iribarren Pablo

Dr. Nores Gustavo

EVALUADOR EXTERNO

Dr. Francisco Urbano

Curiosos hurgan,

¿Qué indagan?

¿Qué buscan?

¿Qué respuesta tienen para ese hombre que desespera?

Bruno Roeschlin

A mis padres.

A mi hermana.

A mis abuelos.

A las mujeres que forman parte de mi vida.

El presente trabajo de tesis ha sido realizado en el Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC) perteneciente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo a la reglamentación vigente en dicha facultad para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Durante la ejecución de este trabajo, la autora fue becaria de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (FONCyT) 2007-2010 y luego de CONICET 2011-2013, cumplimentó con los cursos requeridos y se desempeñó como profesor asistente (dedicación simple) en el Departamento de Farmacología hasta la fecha. Para su realización contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por CONICET, la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (FONCyT) y el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba (MINCyT). Además, Beca de Travel Awards de la International Society for Neurochemistry (ISN), categoría 1 A para estadías cortas en otros laboratorios.

Durante el trabajo de tesis parte de los resultados fueron publicados o se encuentran en preparación. Se indica también los trabajos realizados en colaboración por parte de la tesista.

- Assis MA, Valdomero A, **Garcia-Keller C**, Sotomayor C and Cancela LM. Decrease of lymphoproliferative response by amphetamine is mediated by dopamine from the nucleus accumbens: influence on splenic met-enkephalin levels. *Brain Behav Immun*. 2011 May; 25 (4): 647-57.
- Esparza A, Bollati F, **Garcia-Keller C**, Virgolini M, Lopez LM, Brusco A, Kalivas PW, and Cancela LM. Stress-Induced Sensitization To Cocaine: Actin Cytoskeleton Remodeling Within Mesocorticolimbic Nuclei. *Eur J Neurosci*. 2012. Oct; 36 (8): 3103-17.
- Arroyo DS, Soria JA, Gaviglio EA, **García-Keller C**, Cancela LM, Rodriguez-Galan LC, Ji Ming Wang and Iribarren P. Toll-like receptor 2 ligands promote microglial cell death by inducing autophagy. *FASEB Journal*, 2013. Jan; 27 (1): 299-312.
- **Garcia-Keller C**, Martinez SA, Esparza A, Bollati F, Kalivas PW and Cancela LM. Cross-Sensitization Between Cocaine and Acute Restraint Stress is Associated with Sensitized Dopamine but not Glutamate Release in the Nucleus Accumbens. *Eur J Neurosci*. 2013. Jan 29.
- Mongi Bragato B, Zamponi E, **García-Keller C**, Virgolini M, Assis MA, Mascó DH, Zimmer A, Cancela LM. "Enkephalin is essential for the molecular and behavioral expression of cocaine sensitization" (manuscrito en revisión).

Agradecimientos

Deseo agradecer muy especialmente a la Dra Liliana Cancela por haberme dado la oportunidad, haber confiado en mí y darme su apoyo incondicional todos estos años. Porque además de haber sido una gran mentora, también fue una gran consejera.

Deseo agradecer a los miembros de la comisión de tesis Dra Miriam Virgolini, Dr Pablo Iribarren y Dr Gustavo Nores, por su apoyo durante estos años, su buena predisposición y sugerencias a lo largo de esta tesis. Además, deseo agradecer a Miriam por su comprensión y consejos fuera del marco de la tesis.

Deseo agradecer al Dr Francisco Urbano por aceptar ser el evaluador externo de esta tesis, por su tiempo en revisarla y sus valiosos aportes para nuestro grupo.

Deseo agradecer al Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas por haberme aceptado, haberme facilitado el lugar y materiales para trabajar. A los profesores del Departamento: Liliana, Victor, Techí, Irene, Susana, Miriam, Mariela, Claudia y Gastón por el apoyo y discusiones en estos seis años de tesis.

A Lorena por su ayuda incondicional con los experimentos e infinita paciencia, y especialmente a Estela que dedico parte de su tiempo a enseñarme disecciones, cirugías y estrategias de inyecciones.

A Nico, Yani y Javier como así también a los secretarios Silvia y María Jose que con sus trabajos diarios colaboraron y ayudaron en la realización de esta tesis.

A todos los chicos del Departamento (a los nuevos y viejitos también): Noelia, Marisa, Pablo, Vane, Nati, Lauri G, Mara, Emy, Ivana, Romi, Fabri y Silvi B por los mates compartidos en el laboratorio, risas y discusiones, pero además fuera del departamento amistad y asados.

A todo el grupo Cancela: Lauri D, Andrea, Pauli y Beta sobre todo por acompañarme en esta etapa final, por su sostén y todas las veces que me escucharon. A Flavia por sus charlas y consejos, por enseñarme sobre western blot como así también por su comprensión e infinito aguante.

A todos los que ya no forman parte del departamento pero que contribuyeron a mi crecimiento personal y académico: Amparo, Coti P, Mariana, Sami, Pato y Flor. Además, agradecer con mucho cariño a Ale por todos los años compartidos, todos los aciertos y desaciertos, las infinitas discusiones y viajes de congresos, por estar y acompañar.

Pero muy especialmente quiero agradecer a todo el departamento por hacerme sentir que además de mi lugar de trabajo, farmacología era mi segundo hogar.

Deseo agradecer al Dr Kalivas por recibirme y permitirme trabajar en su laboratorio por tres meses. A los miembros de su laboratorio Yoni, Robbyn, Charles, Cassie, Kate, Sade, Rachel y Michael que colaboraron con mis experimentos y discusiones, pero que además compartieron su afecto durante mi estadía.

Además quiero agradecer al grupo de Pablo Iribarren, Daniela, Javier, Emilia y Claudio por los trabajos realizados en conjunto, entre mates charlas y madrugadas.

A toda la Facultad de Ciencias Químicas por recibirme, permitirme realizar este sueño y hacerme sentir orgullosa de nuestra UNC. A todas las personas que forman parte de los diferentes departamentos y de los cuales me llevo algunos amigos invaluable.

A mis padres, Liana y Gustavo, por acompañarme, por alentarme en mi carrera y en mi vida todos estos años, por estar cada vez que bajaba los brazos. A mi hermana, Agostina, porque siempre crees en mí y me das fuerzas.

Abuelos, tíos y primos gracias a todos por las infinitas veces que me escucharon hablar de mi tema, por formar una parte muy importante de mi vida, y perdón por todos los domingos o cumpleaños que me perdí.

A mis amigos y compañeros de estudio Ana, Nati, Vani, Esteban, Jor, Ruth, Jorge, Lucio, Luciano, Tomas y Walter por todos los años e historias compartidas, y una amistad que va a superar el tiempo y las distancias.

A mis amigas de la vida, como a mí me gusta decir, Luz, Huerto, Nati, Yupi y Lauri por darle a mi vida un tinte de otros colores, por una amistad incondicional a lo largo de todos estos años. A todos mis amigos del grupo de Carlos Paz y muy especialmente a Maxi, porque además de ser de fier todos estos años, estos meses fuiste un sostén muy importante para mí. A las chicas del pilates, por tantas horas de ejercicio mezcladas con mates, risas e historias y Ani M por las incontables horas que hemos pasado haciéndonos compañía y ayudándonos la una a la otra.

Especialmente a las mujeres que forman parte de mi vida:

A mi madre, Liana, por enseñarme tu fuerza

A mi tía, Lisi, por mostrarme el amor por la ciencia

A mi abuela, Fanny, por mostrarme el amor por el arte

A mi hermana, Agostina, por ser mi debilidad.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	15
GENERALIDADES	16
SENSIBILIZACIÓN.....	19
CIRCUITO DE LA MOTIVACIÓN	22
SUSTRATOS NEUROBIOLÓGICOS COMUNES ENTRE PSICOESTIMULANTES Y ESTRÉS...	26
SISTEMA DOPAMINÉRGICO	28
Dopamina: Neurotransmisor Catecolaminérgico más Importante del SNC.	28
Síntesis, Metabolización y Eliminación.....	29
Receptores Dopaminérgicos	29
Rol del sistema Dopaminérgico en la Inducción y Expresión de la Sensibilización	30
SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	30
Glutamato: Neurotransmisor Excitatorio más Abundante del SNC.....	30
Glutamato Intracelular y Extracelular	31
Síntesis y Metabolismo del Glutamato	31
Intercambiador Cisteína/Glutamato	32
Receptores Glutamatérgicos Ionotrópicos y Metabotrópicos	33
Rol de los Receptores AMPA en la Expresión de la Sensibilización	36
Rol de los Receptores NMDA en la Expresión de la Sensibilización.....	38
Transportadores Glutamatérgicos	40
Homeostasis Glutamatérgica.....	41
Alteración de la Homeostasis de Glutamato en la Expresión de la Sensibilización y Cambios Neuroadaptativos.	43
Herramientas Terapéuticas para Restablecer la Homeostasis	44
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	46
HIPÓTESIS.....	47
OBJETIVO GENERAL.....	47
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
GENERALIDADES METODOLÓGICAS	54
Animales	54
Estrés Agudo por Inmovilización	54
Modelo Experimental.....	55
Análisis Estadístico	55
CIRUGÍAS.....	55

ESTUDIOS CONDUCTUALES	56
Registro de la Actividad Locomotora	57
ESTUDIOS BIOQUÍMICOS.....	58
MICRODIÁLISIS.....	58
WESTERN BLOT	62
CAPTACIÓN DE GLUTAMATO-H ³	65
ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS	66
Decaimiento de las Corrientes NMDA	67
Relación de AMPA/NMDA.....	67
DROGAS	68
RESULTADOS	70
1. Influencia de la Exposición a Estrés Agudo por Inmovilización Sobre los Efectos Estimulantes Motores de Cocaína y Liberación de DA en NAc Core y Shell.	71
2. Influencia de la Exposición a Estrés Agudo por Inmovilización Sobre la Expresión de Superficie de Receptores AMPA en Membranas de NAc, así como el Rol Funcional de los receptores AMPA, en la Expresión de la Sensibilización Cruzada, sobre las Propiedades Estimulantes de Cocaína en la Actividad Motora y la Liberación de DA en NAc Core y Shell.	77
3. Influencia de la Exposición a Estrés Agudo por Inmovilización en la Homeostasis Glutamatérgica de NAc Core y Shell, Basal y en Respuesta a Cocaína.....	89
4. Influencia del Tratamiento Previo de Ceftriaxona sobre la Expresión de la Sensibilización Inducida por Estrés Agudo por Inmovilización, a las Propiedades Estimulantes Motoras de Cocaína y los Cambios en la Homeostasis Glutamatérgica Asociados: Medidos por Determinación Neuroquímica (captación de Glu en NAc Core) y Registros Electrofisiológicos de Funcionalidad de la Pre y Post-sinapsis (Desborde de Glu y Relación de las Corrientes AMPA/NMDA).	96
DISCUSIÓN	105
Una sola sesión de estrés por inmovilización induce sensibilización a los efectos estimulantes motores y en la liberación de DA luego de cocaína en Core, pero no en Shell.	108
Implicancia de la Homeostasis Glutamatérgica en la expresión de la sensibilización a cocaína inducida por una sola sesión de estrés por inmovilización.	115
Implicancia del Restablecimiento de la Homeostasis Glutamatérgica en la Expresión de la Sensibilización Cruzada.....	116
Cambios plásticos inducidos por estrés que subyacen a la sensibilización a cocaína.....	119
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

ABREVIATURAS

AA: Autoadministración

ABP: Proteína de Unión a Actina

Amig. Ext: Amígdala Extendida

AMPA: α -amino-3-hidroxi-4-isoxazole ácido propiónico

ATV: Área Tegmental Ventral

BH4: Tetrahidrobiopterina

BLA: Amígdala basolateral

BAC/MUS: Baclofen y Muscimol, Agonistas GABA A y B

Cis: Cisteína

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona

CPfd: Corteza Prefrontal Dorsal

CPfv: Corteza Prefrontal Ventral

CRF: Factor Liberador de Corticotrofina

DA: Dopamina, 3,4-dihidroxifenilalanina

DAT: Transportador de DA

DMSO: Dimetilsulfóxido

EAAT: Transportadores de Amino Ácido Excitatorio

ED: Estriado Dorsal

GABA: Ácido Gama Amino Butírico

Glu: Glutamato

Gln: Glutamina

GLT-1: Transportador Glutamatérgico

GSH: Glutación

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IP3: Inositol-1,4,5-trifosfato

KA: Kainato

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina

LIMK: LIM kinasa

EPSCs: Corrientes Postsinápticas Excitatorias

mGluR: Receptor Metabotrópico de Glutamato

MSN: Neuronas Medianas Espinosas

NAc: Núcleo Accumbens

NBQX: 6-nitro-7-sulfamobezo(f)quinoxalina-2,3-diona

NMDA: N-metil-D-aspartato

LTP: Potenciación a Largo Plazo

PSD: Densidad Postsináptica

SLC: Familia de Transportadores *Solute Carrier*

SNC: Sistema Nervioso Central

TARP: Proteína transmembrana reguladora del receptor AMPA

TH: Tirosina Hidroxilasa

VMAT: Transportador Vesicular de Monoaminas

VP: Ventral Pallidum

xCT: Subunidad Catalítica del Intercambiador

XC-: Intercambiador Cis/Glu

RESUMEN

Los comportamientos que caracterizan a la adicción como la búsqueda de droga y el consumo compulsivo de droga no pueden ser explicados solo por el deseo de experimentar placer (efectos hedónicos positivos de la droga) o el deseo de calmar la abstinencia (evitar los efectos adversos de los síntomas de la abstinencia) (Markou y col., 1993). Por lo tanto, se propuso abordar este tema a partir de la sensibilización motivacional [*“incentive-sensitization”* (Robinson y Berridge, 1993, 2000)]. Esta teoría postula que la sensibilización inducida por drogas provoca una atribución excesiva de la saliencia motivacional (*incentive salience*) relacionada con la recompensa. Este fenómeno no solo se ha visto en relación a drogas sino que también puede extenderse al efecto que produce la exposición a situaciones de estrés sobre la acción de psicoestimulantes denominándose “sensibilización cruzada”. Es así como la adicción a drogas es un desorden multifactorial en el que las experiencias previas del individuo, como la influencia del estrés, interactúan modulando las respuestas del individuo frente a sustancias adictivas y aumentando su vulnerabilidad a desarrollar adicción a drogas (Chen y Anthony, 2004).

El tratamiento agudo o repetido de psicoestimulantes (Vanderschuren y col., 1999; Pierce y col., 1996) como la aplicación de estresores de forma aguda o crónica (Stewart y Kalivas, 1991; Robinson, 1985, Lu y col., 2003) inducen cambios a largo plazo en la sensibilización conductual y neuroquímica en la expresión de la sensibilización. Considerando, que el estrés aumenta la liberación de Hormona Liberadora de Corticotrofina (CRF) en Área Tegmental Ventral (ATV) y aumenta la respuesta de neuronas dopaminérgicas frente a eferentes de neuronas glutamatérgicas (Saal y col., 2003; Ungless y col., 2003), las adaptaciones inducidas por estrés mediarían cambios permanentes en la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica del Núcleo Accumbens (NAc) (Kalivas y Stewart, 1991; Mameli y col., 2009).

Teniendo en cuenta que el NAc es una estructura heterogénea que puede ser separada histológicamente en dos sub-estructuras Core y Shell (Pennartz y col., 1994) y que la liberación de dopamina (DA) en Core o Shell es diferencial dependiendo de la droga (Di Chiara, 2002), consideramos pertinente evaluar la liberación de DA en NAc Core y Shell, y la correlación temporal con la expresión de la sensibilización a los efectos estimulantes motores de cocaína. Por otro lado, conociendo la interacción de DA y glutamato (Glu) en NAc, y el rol crítico del Glu en la expresión de la sensibilización a cocaína luego del tratamiento repetido, consideramos pertinente también evaluar la liberación y homeostasis glutamatérgica, el rol de los receptores tipo AMPA y su interacción con el sistema

dopaminérgico diferenciando las subestructuras del NAc en animales que fueron expuestos a una sola sesión de estrés.

Este estudio provee evidencias que tres semanas después de la exposición a una sesión de estrés de inmovilización, se observó un aumento de los efectos estimulantes de cocaína sobre la actividad motora así como sobre la liberación de DA en el NAc Core, pero no Shell, mayor al observado en el grupo control. Por otro lado, se demostró el rol de los receptores glutamatérgicos AMPA en la expresión de la sensibilización a los efectos estimulantes motores luego de microinyecciones del agonista AMPA administradas en NAc Core, pero no en Shell, en animales previamente estresados. Consistentemente, la expresión del fenómeno de sensibilización conductual y neuroquímica a cocaína inducida por estrés agudo fue suprimido por la administración de un antagonista del receptor AMPA, CNQX, en NAc Core antes de la administración de la dosis desafío de cocaína. Estas evidencias se correlacionaron con un aumento en la expresión de superficie de los receptores AMPA en el grupo de animales expuestos previamente a estrés, sin denotarse un efecto por la inyección aguda de cocaína. Se evaluó además, la homeostasis y liberación de Glu evidenciando un aumento en los niveles basales de Glu extracelular en NAc Core que se correlacionan con una disminuida expresión del transportador GLT-1 en animales que fueron estresados; y que frente a una dosis desafío de cocaína liberaban en proporción menos Glu. En la misma línea, se demostró el rol crítico de la homeostasis glutamatérgica en la expresión de la sensibilización cruzada debido a que el tratamiento previo con Ceftriaxona revirtió la expresión de este fenómeno, reestableciendo la actividad del GLT-1 y disminuyendo el desborde de Glu observado en NAc Core de animales previamente estresados. Sin embargo, Ceftriaxona no logró revertir el aumento de la relación de corrientes AMPA/NMDA observado por la condición estrés. En resumen, los cambios plásticos a nivel de las neuronas postsinápticas de NAc principalmente Core demuestran la relevancia de la participación de los receptores AMPA en la expresión de la sensibilización cruzada a cocaína inducida por estrés agudo, aunque en la expresión de la sensibilización conductual no solo intervienen los cambios en la postsinapsis sino también los que ocurren en la presinapsis glutamatérgica.

Finalmente, los presentes resultados sugieren que los cambios plásticos inducidos por una sola sesión de estrés en la postsinápsis glutamatérgica como el aumento de la expresión de superficie del receptor AMPA, la alteración en la homeostasis y liberación de glutamato, en interacción con los cambios observados en la presinapsis dopaminérgica en el NAc Core,

podrían estar contribuyendo al aumento de la saliencia motivacional que caracteriza a la sensibilización a cocaína inducida por estrés agudo. Este estudio contribuye a la comprensión de los mecanismos neurobiológicos que median la influencia proactiva del estrés en la adicción a cocaína, y refuerza la observación clínica que el estrés de la vida puede ser un factor de vulnerabilidad en el desarrollo de adicción a cocaína.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

Marco Conceptual

Es bien conocido, dentro de la neurociencia de la adicción, que a pesar del gran número de personas que prueban o consumen droga por períodos variables de tiempo solo un determinado número desarrolla adicción, es decir uso compulsivo de drogas que se convierte en la actividad principal del sujeto (O'Brien y col., 1986). El porcentaje de personas que desarrollan adicción en una población es de un 10 o un 15%. Para explicar la transición de uso de drogas a la adicción, se han propuesto dos principales marcos teóricos o paradigmas que pueden ser definidos como “centrado en la droga” o “centrado en el individuo” (Piazza y Le Moal, 1998).

El enfoque más intensamente estudiado se centra en la droga como la principal causa de adicción, se trata de identificar los efectos neurobiológicos y conductuales que son los responsables de las propiedades adictivas de las drogas (Koob y Bloom, 1988; Wise y Rompre, 1989; Nestler, 1992; Robinson y Berridge, 1993). La mayoría de las investigaciones se han enfocado en los sustratos neurales de las acciones del reforzamiento positivo de las drogas y los mecanismos por los que estas sustancias inducen tolerancia, sensibilización, condicionamiento, dependencia y abstinencia. Desde esta perspectiva, la dependencia es un desorden iatrogénico y numerosas aplicaciones terapéuticas e investigaciones están orientadas hacia la comprensión de las acciones farmacológicas y toxicológicas de las sustancias psicoactivas. Este paradigma es dominante en los laboratorios de investigación donde los animales son generalmente estudiados en relación al tipo y cantidad de sustancia consumida o administrada, y en los que se intenta contrarrestar por medios farmacológicos los efectos inducidos por drogas. La fuerza del paradigma centrado en la droga es la capacidad para dilucidar los cambios neurobiológicos que ayudan a explicar la transición del uso inicial de sustancias al comportamiento compulsivo y la pérdida de control del individuo. Sin embargo, una limitación importante de este enfoque es que considera las diferencias individuales en la aparición de la adicción como artefactos del protocolo de investigación. Estudios más recientes, que tienen sus bases en estudios clínicos y epidemiológicos, consideran al abuso de drogas como un fenómeno que aparece solo en individuos particularmente vulnerables. Numerosos estudios han demostrado que la tasa de consumo de sustancias aumenta de acuerdo con el sexo, la edad, educación, ingresos y variables socio-demográficas (Chen y Anthony, 2004; Crum y col., 2005; Grant y col., 2001; Hasin y col.,

2007; Kessler y col., 2005; Swendsen y col., 2009; Warner y col., 1995). Más aún, disciplinas como psicología clínica y psiquiatría, hallaron una fuerte asociación entre la dependencia a sustancias y ciertos rasgos de personalidad o comorbilidad con trastornos mentales (Conway y col., 2002; Grant y col., 2004; Kessler y col., 1997, 2005; Merikangas y col., 1998; Swendsen, 2002, 2010). Por otro lado, la neurociencia ha demostrado que los factores genéticos y biológicos también llevan a una predisposición a estos desórdenes (Gelernter y Kranzler, 2009; Le Moal y Koob, 2007; Koob y Zorrilla, 2010). Se ha demostrado que estos factores tomados individualmente o en combinación contribuyen a rasgos psicobiológicos que llevan al sujeto a ser más vulnerable a desarrollar adicción. En este sentido, la visión “centrada en el individuo” ubica a la variación individual en el centro de interés. La adicción aparece en algunos individuos donde sus características biológicas generan respuestas patológicas a las drogas (Piazza y Le Moal, 1996), estas respuestas harían que las propiedades apetitivas de las drogas sean mayores en algunos sujetos, desencadenando un aumentado deseo por la droga. Si bien la perspectiva “centrada en el individuo” tiene en cuenta las investigaciones epidemiológicas y clínicas, la caracterización de estas en los laboratorios es más reciente. Aunque en este sentido, es de destacar que la gran diferencia individual observada en humanos ha sido reflejada en el trabajo pionero de Piazza y Le Moal, (1989). Estos autores demostraron en ratas: (i) una marcada diferencia individual en el desarrollo de autoadministración (AA) a psicoestimulantes, (ii) una diferente predisposición a la toma y búsqueda de droga dentro y entre diferentes cepas de animales, y (iii) una correlación positiva entre la magnitud de la reactividad del animal y la cantidad de droga autoadministrada durante la etapa de adquisición.

Investigaciones sobre la influencia del estrés en la adicción a drogas han conceptualizado al estrés dentro del marco teórico del paradigma “centrado en el individuo”. Los estudios sobre estrés contribuyeron a demostrar que el estado biológico del individuo juega un rol importante en determinar la propensión a desarrollar dependencia y remarcaron la importancia de la condición ambiental en la inducción de un fenotipo adictivo. Existen numerosos estudios en humanos que evidencian una mayor prevalencia de abuso de drogas en individuos que previamente estuvieron expuestos a estresores ambientales sociales (Brown y col., 1995) y en pacientes diagnosticados con desórdenes de estrés postraumáticos (PTSD, Jacobsen y col., 2001). Además en estudios correlacionales se ha demostrado una alta comorbilidad entre estrés y enfermedades psiquiátricas como ansiedad, depresión (Brady y col., 1997) y abuso de drogas (Kandel y col., 1997). Más aún, existe una larga lista de literatura que demuestra la asociación entre eventos como abuso sexual/acoso, estrés de

combate, estrés ocupacional, traumas físicos con abuso de psicoestimulantes, opioides o alcohol (Aro, 1981; Triffleman y col., 1995; Richman y col., 1996; Brown y col., 2006; Brady y col., 2001; Clark y col., 2001; Ompad y col., 2005; Reed y col., 2007) y en particular, eventos relacionados con experiencias traumáticas durante la niñez juegan un rol importante en la susceptibilidad a drogas de abuso (Dembo y col., 1988; Newcomb y Bentler, 1988; Harrison y col., 1997; Dube y col., 2003; Mullings y col., 2004; Osler y col., 2007; Fothergill y Ensminger, 2006).

Se han utilizado diferentes modelos animales para representar experiencias adversas de la vida, estos modelos varían considerablemente desde el punto de vista de la predicción y validación dada por numerosas variables que lo influyen como tiempo de exposición, edad, intensidad del estresor, estrés agudo o crónico, predictivo o no predictivo (Lu y col., 2003). Por lo tanto, el efecto resultante obtenido puede ser específico del tipo de estrés realizado, del modelo o de la droga.

A pesar de las diferencias entre los modelos de estrés estudiados, se ha demostrado que el estrés es capaz de modificar a nivel neurobiológico, la motivación y/o aumentar las propiedades reforzantes de las drogas de abuso. Trabajos de laboratorios como el de Kalivas y Stewart (1991), Piazza y Le Moal (1998) y Pacchioni y col. (2007) han demostrado que el estrés incrementa la actividad de los circuitos neurobiológicos dopaminérgicos implicados en la motivación y recompensa. Más específicamente, las neuronas mesencefálicas, las cuales proyectan rostralmente desde Área Tegmental Ventral (ATV) hacia Núcleo Accumbens (NAc) y regiones corticales, parecen ser los sustratos neurobiológicos donde hormonas como el factor liberador de corticotrofina (CRF) y glucocorticoides, liberadas durante eventos estresantes, aumentan su actividad y, por lo tanto, aumentan la tendencia a autoadministrarse drogas de abuso (Piazza y Le Moal, 1996; Koob y Bloom, 1988; Wise, 1996). De esta forma se ha propuesto que el estrés y el consumo de drogas comparten sustratos neuronales comunes.

Investigaciones que apoyan el paradigma “centrado en el individuo” se han enfocado en factores conductuales y biológicos que predisponen a ciertos individuos al abuso de drogas y en el origen de las diferencias interindividuales en la conducta, y no solo como consecuencia de los efectos de la sustancia. Es así como la adicción a drogas es un desorden multifactorial en el que variables genéticas, ambientales y las experiencias previas del individuo, como la influencia del estrés, interactúan modulando las respuestas del individuo frente a sustancias adictivas y aumentando su vulnerabilidad a desarrollar adicción a drogas (Chen y Anthony, 2004).

SENSIBILIZACIÓN

La mayoría de las explicaciones sobre la adicción postulan que la motivación de las personas adictas al consumo de drogas primariamente proviene de dos fuentes: el deseo de experimentar efectos hedónicos positivos de la droga o el deseo de evitar los efectos adversos de los síntomas de la abstinencia (Markou y col., 1993). Sin embargo, el comportamiento de búsqueda de drogas y el consumo de drogas compulsivo que caracteriza a la adicción a menudo no es el placer o el deseo de calmar la abstinencia (Robinson y Berridge, 1993, 2000). Por esto se ha propuesto abordar este tema a partir de la sensibilización motivacional [*“incentive-sensitization”* (Robinson y Berridge, 1993, 2000)]. En esta teoría se postula que la sensibilización inducida por drogas provoca una atribución excesiva de la saliencia motivacional (*incentive salience*) relacionada con la recompensa, esto podría llevar a desencadenar patrones de compulsión y de búsqueda de droga en personas que desarrollaron adicción y son susceptibles a recaer aún después de largos períodos sin consumo (Robinson y Berridge, 1993). Es interesante remarcar que este fenómeno no solo se ha visto en relación a drogas sino también con reforzadores naturales como sucrosa (Wvell y Berridge, 2001) o incentivo sexual (Fiorino y Phillips, 1999a, b; Mitchell y Stewart, 1990a) en animales con previa exposición repetida a anfetamina o morfina. Una de las evidencias de la sensibilización motivacional es la sensibilización psicomotora.

La sensibilización conductual o psicomotora hace referencia a un aumento progresivo y duradero de las respuestas conductuales específicas que ocurren durante la administración repetida a psicoestimulantes y persiste por períodos largos de abstinencia (Kalivas y Stewart, 1991). La sensibilización, un fenómeno también observado en humanos (Sofuoglu y col., 2007), ha sido ampliamente estudiada en modelos de sensibilización locomotora en roedores y principalmente en psicoestimulantes como cocaína y anfetamina (Dougherty y Ellinwood, 1981; Robinson y col., 1998) como así también en opioides (Vezina y Stewart, 1989), y en menor medida en Δ -9 tetrahidrocanabinol (Cadoni y col., 2001) y nicotina (Benwell y Balfour, 1992).

La inducción de la sensibilización por pre-exposición a drogas es altamente dependiente de la naturaleza del tratamiento previo, sin embargo, dosis intermitentes y moderadas o bajas son más efectivas para inducir sensibilización que exposiciones a dosis altas y crecientes (Post, 1980; Robinson y Becker, 1986; Stewart y Badiani, 1993; Vanderschuren y col., 1997). Es interesante remarcar que la sensibilización puede ser observada desde varios meses hasta un año después de haber sido inducida por el tratamiento

repetido del psicoestimulante (Paulson y col., 1991) y puede acentuarse luego de períodos libres del mismo (Vanderschuren y Pierce, 2010). Se ha demostrado además, que la sensibilización conductual puede ser dependiente o independiente del contexto (Stewart y Druhan, 1993; Anagnostaras y Robinson, 1996; Robinson y col., 1998). Por otro lado, evidencias de numerosos laboratorios han revelado que no solo la administración repetida de una misma droga induce sensibilización, sino una sola exposición a cocaína o anfetamina también es capaz de inducir sensibilización conductual y neuroquímica (Vanderschuren y col., 1999; Robinson y col., 1982; Robinson, 1984; Peris y Zahniser, 1987; Kalivas y Alesdatter, 1993). Más interesante aún, se ha evidenciado el desarrollo de “sensibilización cruzada” entre drogas de distintas características farmacológicas. Animales que fueron tratados crónicamente con cocaína demostraron sensibilización cruzada a las propiedades estimulantes motoras (McDaid y col., 2005) y reforzantes (Shippenberg y col., 1998) de morfina, y estos efectos también se observaron luego de una sola inyección de cocaína (Kim y col., 2004). Igualmente fue demostrado en animales tratados con heroína, sensibilización conductual a los efectos estimulantes de cocaína (Leri y col., 2003), y ratas tratadas con morfina demostraron sensibilización cruzada locomotora (Yoo y col., 2003) y propiedades reforzantes aumentadas (Shippenberg y col., 1998) a cocaína. Estas evidencias indican que las drogas de abuso a pesar de ser farmacológicamente diferentes, comparten sustratos neuronales comunes y podrían jugar un rol importante en la escalada de consumo de droga y en el desarrollo de una mayor vulnerabilidad a adicción en poblaciones que muestran policonsumo de drogas.

A partir de la sensibilización cruzada por diferentes drogas de abuso, se desprende el fenómeno de sensibilización cruzada inducida por estrés agudo o crónico, que se manifiesta luego de una dosis aguda del psicoestimulante o viceversa. El estrés ha sido definido como la exposición forzada a eventos o condiciones que normalmente son evitadas por los sujetos no-humanos del laboratorio (Lu y col., 2003). Estos eventos o condiciones pueden ser ampliamente divididos en dos categorías. La primera consiste en exponer al animal a un evento ambiental aversivo, que incluye estresores como inmovilización, pinchazo en la cola o derrota. La segunda categoría incluye estresores como deprivación de comida, aislamiento social y deprivación maternal, y consiste en la eliminación de una condición ambiental que es importante para mantener condiciones de equilibrio fisiológico y psicológico normal del sujeto.

Existe evidencia que demuestra la influencia proactiva del estrés en la conducta y las respuestas neuroquímicas a numerosas drogas de abuso. El aumento en los efectos de los psicoestimulantes inducido por estresores ha sido observado por numerosos laboratorios,

incluyendo el nuestro, tanto a niveles conductuales como bioquímicos (Camp y Robinson, 1988; Rouge-Pont y col., 1995; Deroche y col., 1995; Kalivas y Stewart 1991; Pacchioni y col., 2007). Se ha demostrado que la exposición a diferentes estresores como pinchazo en la cola, choque eléctrico en las patas o restricción de comida inducen potenciación a los efectos estimulantes de anfetamina y cocaína (Lu y col., 2003). Como así también aumento a las propiedades reforzantes utilizando un modelo de autoadministración (AA) (Piazza y LeMoal, 1998; Shaham y col., 2003) en animales que fueron previamente estresados. Concretamente, datos de nuestro laboratorio han propuesto y demostrado que los efectos del estrés por inmovilización de forma aguda o crónica, conducen a una respuesta sensibilizada frente a una dosis desafío de droga. Así es como Diaz-Otañez (1997), del Rosario CN (2002a, b) y Capriles y Cancela (1999, 2002) demostraron que una sola sesión de estrés por inmovilización es suficiente para inducir sensibilización conductual a los efectos estimulantes motores y propiedades reforzantes de anfetamina y morfina; así como un aumento en la liberación de dopamina (DA) por anfetamina en áreas relacionadas con el reforzamiento (Pachioni y col., 2007). Además se demostró que el estrés crónico por inmovilización induce aumento de la actividad locomotora luego de una dosis desafío de anfetamina (Diaz-Otañez y col., 1997), morfina (del Rosario y col., 2002a), y cocaína (Esparza y col., 2012), como así también cambios en la dinámica de actina y expresión de receptores glutamatérgicos de tipo AMPA en membranas de superficie de núcleo accumbens, un núcleo cerebral fundamental en el circuito del reforzamiento (Esparza y col., 2012).

Dada la dependencia por el contexto y la persistencia en el tiempo, la sensibilización ha sido propuesta como mecanismo neural central que conduce a la adicción (Robinson y Berridge, 1993, 2001; Kalivas, 2004; Vezina, 2004), y concretamente se ha propuesto a la saliencia motivacional como una de las teorías de la adicción que sostiene que la sensibilización de los circuitos neuronales lleva a respuestas conductuales sensibilizadas. Este proceso de sensibilización ha sido asociado a estadios tempranos dentro del espiral de la adicción como así también a la recaída (Robinson y Berridge, 2000; Vezina y col., 2002). Basados en datos de la sensibilización cruzada a las propiedades estimulantes entre drogas y estrés se evidencia que los mecanismos neurobiológicos que subyacen a las respuestas estimulantes aumentadas inducidas por estrés se parecen a aquellas observadas por el tratamiento repetido de drogas (Kalivas y Stewart, 1991).

Iniciación y Expresión de la Sensibilización

Un concepto fundamental en la sensibilización es que este fenómeno puede ser estudiado en dos dominios temporal y anatómicamente diferentes: iniciación y expresión (Kalivas y Stewart, 1991; Robinson y Becker, 1986). La iniciación de la sensibilización conductual a psicoestimulantes es operacionalmente definida como secuencia transiente de eventos celulares y moleculares precipitados por la administración de psicoestimulantes, que lleva a cambios duraderos en la función neuronal y es responsable del aumento de la respuesta conductual. La expresión se define como las alteraciones neuronales perdurables derivadas del proceso de iniciación que median directamente la respuesta conductual aumentada. Existe una marcada dependencia temporal en la expresión de la sensibilización conductual y las neuroadaptaciones asociadas. Esto significa que después de la inducción por drogas o por estrés, ocurre una cascada de neuroadaptaciones que conduce al desarrollo de un aumento de la respuesta de forma persistente. Autores como White (1995), Pierce y Kalivas (1997) proponen que estas adaptaciones transientes, generadas durante la inducción, son necesarias para evocar a largo plazo (semanas a meses) las adaptaciones que median de forma persistente la sensibilización conductual. Se ha descrito que la iniciación de la sensibilización conductual a psicoestimulantes ocurre en ATV (Kalivas, 1995; Pierce y Kalivas, 1997); en contraste, los eventos asociados a la expresión se encuentran distribuidos a lo largo de los núcleos interconectados del circuito de la motivación, y más específicamente en NAc (Vanderschuren y Kalivas, 2000).

Esta separación anatómica de los sitios de iniciación y de la expresión implica una transferencia de la sensibilización desde ATV a NAc, presumiblemente, como resultado de cambios de frecuencia de disparos o cambios en los patrones de proyección desde estas estructuras.

CIRCUITO DE LA MOTIVACIÓN

El circuito de la motivación tiene un rol importante en la traducción de un estímulo biológicamente relevante en una respuesta conductual adaptativa (Kalivas y col., 1993). Se activa por estímulos o actividades que promueven la aptitud evolutiva del organismo, como los alimentos ricos en nutrientes, el sexo y la estimulación social. Estudios realizados en la última década demostraron que los núcleos interconectados del circuito de la motivación actúan de forma integrada para permitir u obstruir la expresión de la respuesta conductual a los estímulos ambientales o farmacológicos. El circuito de la motivación está conceptualizado

como un mecanismo de control de ganancia que determina tanto el umbral como la intensidad de la respuesta a un estímulo dado. Se propone que la administración repetida de psicoestimulantes produce cambios a largo plazo en la neurotransmisión que son distribuidos en todo el circuito de la motivación (Pierce y Kalivas, 1997). La conducta de sensibilización ocurre porque estos cambios en la neurotransmisión alteran la ganancia de este circuito, llevando a una respuesta conductual adaptativa, que frente a un estímulo farmacológico se obtiene una mayor respuesta.

Los núcleos del circuito de la motivación se encuentran topográficamente interconectados de forma tal que permiten un flujo de información desde las estructuras límbicas a los sistemas motores piramidales y extra-piramidales (Heimer y col., 1993; Pennartz y col., 1994; Wright y col., 1996). Como se observa en la **figura 1**, la topografía de las interconexiones provee un marco anatómico para que la información fluya desde las estructuras límbicas al sistema motor. La Amígdala inerva preferencialmente ATV, NAc Shell y al área ventromedial del Ventral Pallidum (VPv). Estos tres subnúcleos están recíprocamente interconectados entre ellos, pero no con el sistema motor (Heimer y col., 1993; Wright y col., 1996). Para acceder al núcleo que regula la actividad motora, ATV proyecta a NAc Core y al compartimiento dorsolateral del VP, que se encuentran interconectados con el sistema motor extrapiramidal vías Sustancia Nigra (S Nigra) (Heimer y col., 1993; Kalivas y col., 1993; Mogenson y col., 1985). Además, el compartimiento del VP proyecta al Tálamo medio dorsal que inerva la CPf dorsal. La CPf dorsal prelímbica proyecta preferentemente al Core como así también a la S Nigra (Sesack y col., 1989). Este componente Talámico del circuito de la motivación permite el flujo de información al sistema extrapiramidal, vía interconexión con la CPf.

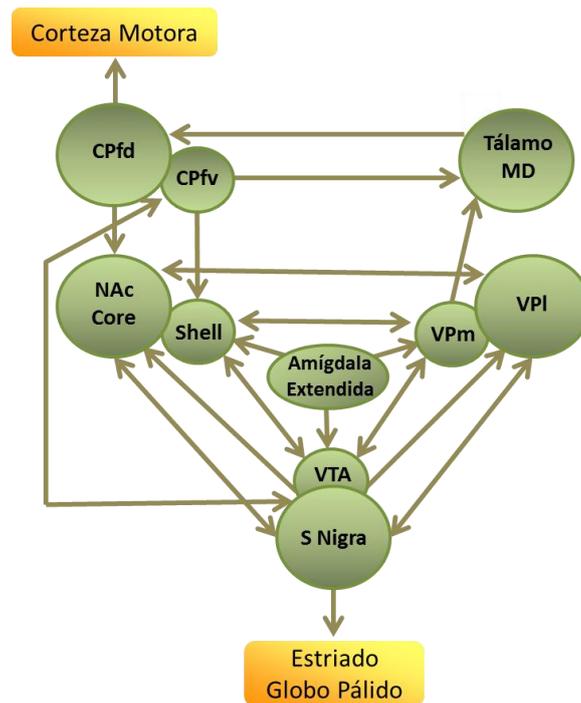


Figura 1. Circuito de la Motivación. La figura muestra las interconexiones entre los subnúcleos del circuito e ilustra como la información se trasmite desde el sistema límbico a los sistemas motores piramidales y extrapiramidales. Tálamo mediodorsal (Tálamo MD), Ventral Pálido lateral (VPI), Ventral Pálido medial (VPm), Núcleo Accumbens Core (NAc Core), Núcleo Accumbens Shell (Shell), Corteza Prefrontal dorsal (CPfd), Corteza Prefrontal ventral (CPfv), Sustancia Nigra (S Nigra), Área Tegmental Ventral (ATV). (Pierce y Kalivas, 1997).

Dentro del circuito de la motivación, la respuesta conductual a estímulos biológicamente relevantes se encuentra asociada con cambios en los niveles extracelulares de los neurotransmisores y la actividad electrofisiológica en los núcleos que la conforman (Mark y col., 1991; Post y col., 1992). Una de las áreas donde la mayoría de los circuitos convergen es el NAc que tiene el rol central en la integración de las aferentes límbicas y corticales glutamatérgicas bajo la influencia moduladora de DA (**figura 2**).

El NAc es parte del complejo de estriado ventral y funciona como una región crítica donde el control de la motivación que proviene de las regiones límbicas hace interfase con el control del circuito motor y regula la conducta apropiada dirigida a objetivos (Mogenson y col., 1980; Groenewegen y col., 1996; Nicola y col., 2000; Zahm, 2000; Wise, 2004). La mayoría de las neuronas de NAc, aproximadamente 90%, son neuronas medianas espinosas (MSN) del tipo gabaérgicas (Meredith y col., 1999). El NAc está subdividido en dos regiones, Core y Shell, que pueden ser distinguidas en base a su morfología, conectividad y

rol funcional. El Core corresponde a la región central por debajo del cuerpo estriado y de forma continua rodea la comisura anterior, el Shell en cambio ocupa las porciones ventral y medial del NAc.

El Shell ha sido relacionado con el sistema límbico e incluido en la amígdala extendida (Heimer y col., 1991; Heimer y col., 1997) y se encuentra interconectado con el hipotálamo y ATV. Juega un rol importante para la modulación de la motivación saliente, reforzamiento y contribuye a establecer asociaciones entre eventos motivacionales y percepción del ambiente (Di Chiara, 1998; 2002). Por otro lado, al Core se lo ha relacionado con el sistema motor, interconectado con la Cingulata Anterior y la Corteza Orbitofrontal; ha sido asociado al Estriado y por esto sería el sitio donde se controla la ejecución de la motivación conductual. Por lo tanto, estaría involucrado en la integración sensorio-motora de la conducta (Zahm y Brog, 1992) y recibe no solo proyección dopaminérgica sino también glutamatérgica.

De esta manera, podría decirse que las propiedades emotivas o motivacionales estarían codificadas en el NAc Shell y las propiedades estimulantes motoras, en cambio, podrían estar codificadas en el Core. El Shell cumple un rol preponderante durante el desarrollo de las conductas adictivas, mientras que el Core mediaría la ejecución más a largo plazo de las conductas relacionadas con la adicción (Di Chiara, 2002; Ito y col., 2004; Meredith y col., 2008).

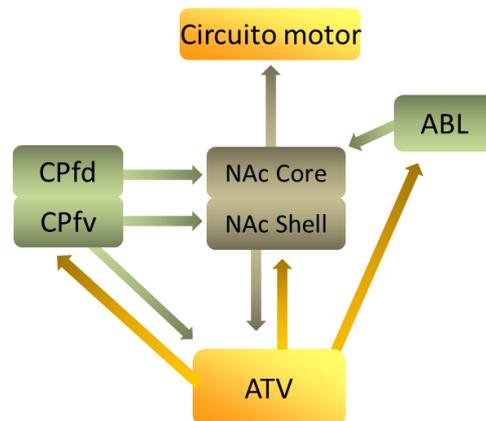


Figura 2. Modelo de las vías dopaminérgicas (línea naranja), glutamatérgicas (línea verde) y gabaérgicas (línea marrón) involucradas en la inducción y expresión de la sensibilización conductual. Amígdala Basolateral (ABL), Núcleo Accumbens Core (NAc Core) y Núcleo Accumbens Shell (NAc Shell). Corteza Prefrontal dorsal (CPfd, prelímbica y cingulata anterior), Corteza Prefrontal ventral (CPfv, infralímbica), Área Tegmental Ventral (ATV). (Vanderschuren y col., 2000).

SUSTRATOS NEUROBIOLÓGICOS COMUNES ENTRE PSICOESTIMULANTES Y ESTRÉS

Los reforzadores naturales, las drogas adictivas y el estrés influyen la conducta como resultado de su habilidad para aumentar la liberación sináptica de DA en el NAc, el mayor componente del estriado ventral (Wise y Bozarth 1987; Koob y Bloom 1988; Di Chiara, 1998; Wise, 1998 **figura 3**). Todas las drogas de abuso aumentan la liberación de DA en NAc, ya sea directa o indirectamente (Johnson y North 1992; Tapper y col., 2004; Waldhoer y col., 2004; Justinova y col., 2005), efecto que también es observado luego de una sesión de estrés agudo o crónico (Kalivas y Stewart, 1991). Diferentes autores como Saal (2003), Wanat (2008) y Korotkova (2006) demostraron un aumento de la liberación de DA en el NAc luego de microinyectar CRF en ATV. Además, utilizando agonistas y antagonistas farmacológicos para CRF evidenciaron que hay receptores para esta hormona en ATV, que participan de la activación y liberación de DA en NAc. La principal fuente de DA en el NAc y estriado dorsal como así también de Amígdala, Hipocampo y Corteza Prefrontal (CPfr), es ATV en el cual se concentran los somas de las neuronas dopaminérgicas.

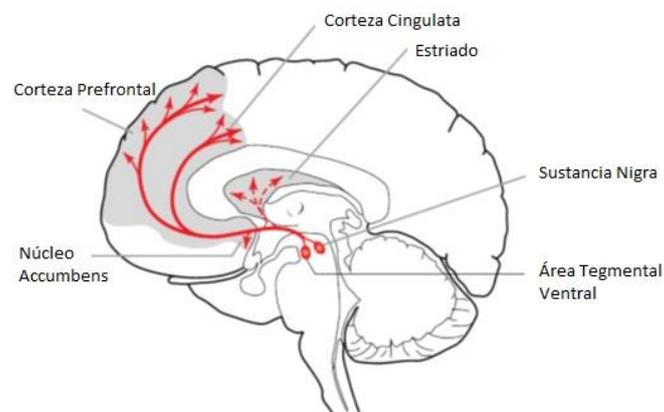


Figura 3. Proyecciones dopaminérgicas hacia el prosencéfalo. Se encuentran ilustradas las proyecciones desde Área Tegmental Ventral hacia Núcleo Accumbens, Corteza Prefrontal y proyecciones desde Sustancia Nigra a Estriado Dorsal (Hyman y col., 2006).

Los psicoestimulantes como cocaína o anfetamina aumentan la concentración extracelular de las monoaminas (DA, serotonina, norepinefrina) debido a que bloquean la recaptación del transportador DAT (transportador de DA) de las monoaminas liberadas de fuentes vesiculares (Ritz y col., 1987).

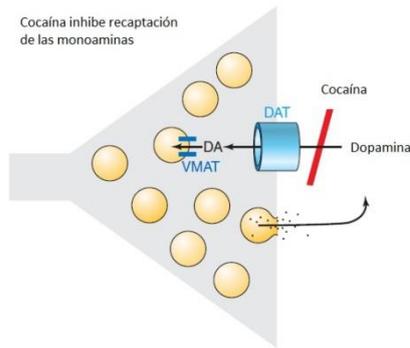


Figura 4. Cocaína bloquea el transportador de DA (DAT) localizado en la membrana presináptica aumentando de forma aguda la concentración de DA extracelular (Hyman y col., 2006).

Si bien el rol preciso de DA aún es debatido, se cree es el componente clave en el desarrollo y expresión de la sensibilización conductual por la administración repetida de droga (Robinson y Berridge, 1993; Pierce y Kalivas, 1997) y por estrés (Kalivas y Stewart, 1991). La proyección dopaminérgica más a menudo vinculada con la sensibilización conductual, es la proyección desde ATV hacia NAc (Le Moal y Simon, 1991), aunque la proyección dopaminérgica desde ATV a CPf y amígdala también se ha visto implicada.

Por otro parte, considerable evidencia ha comprobado que la administración aguda o crónica de psicoestimulantes induce un aumento en la liberación de glutamato (Glu) extracelular en ATV, NAc y estriado (Kalivas y Duffy, 1995; Smith y col., 1995; Reid y Berger, 1996; Reid y col., 1997), debido a que la CPf y Amígdala emiten proyecciones glutamatérgicas corticofugales que inervan una serie de estructuras subcorticales, incluyendo ATV y NAc (Sesack y col., 1989; Sesack y Pickel, 1990; Wright y Groenewegen, 1995, 1996; Wright y col., 1996; orelova y Yang 1997; Groenewegen, 1999). Siguiendo la misma hipótesis de mecanismos comunes entre drogas de abuso y estrés, el grupo de Bonci demostró que la microinyección de CRF en ATV regula la excitabilidad de neuronas dopaminérgicas de VTA, específicamente un aumento de la potenciación sináptica de VTA mediada por los receptores NMDA fue observada luego de la administración de CRF (Ungless y col., 2003). Consistente con estos resultados, el estrés repetido o tratamiento crónico de cocaína aumentó la expresión de superficie del receptor NMDA y del receptor AMPA en ATV (Fitzgerald y col., 1996), y años más tarde se demostró por electrofisiología un aumento en la relación de las corrientes AMPA/NMDA (aumento de la fuerza sináptica) en ATV por estrés y por diferentes drogas de abuso, entre ellas cocaína (nicotina, anfetamina, morfina, alcohol) (Saal y col., 2003). De esta forma, la sensibilización es un mecanismo común disparado por estrés y drogas en las sinapsis excitatorias de neuronas dopaminérgicas (Saal y col., 2003; Ungles y col., 2003), siendo la sensibilización conductual un ejemplo de plasticidad dependiente de la

experiencia que involucra plasticidad en las sinapsis glutamatérgicas (Kauer y Malenka, 2007; Kalivas, 2009).

Por otra parte, estudios ultraestructurales anatómicos del NAc han demostrado que algunas de las proyecciones terminales descendientes de Glu de la corteza prelámbica y aquellas proyecciones ascendentes mesencefálicas dopaminérgicas llegan en cercana aposición entre ellas y forman contactos sinápticos en las mismas neuronas intrínsecas de NAc (**figura 5**) (Sesack y Pickel, 1990, 1992). Esta configuración provee las bases de la posible interacción entre Glu y DA a nivel sináptico en NAc.

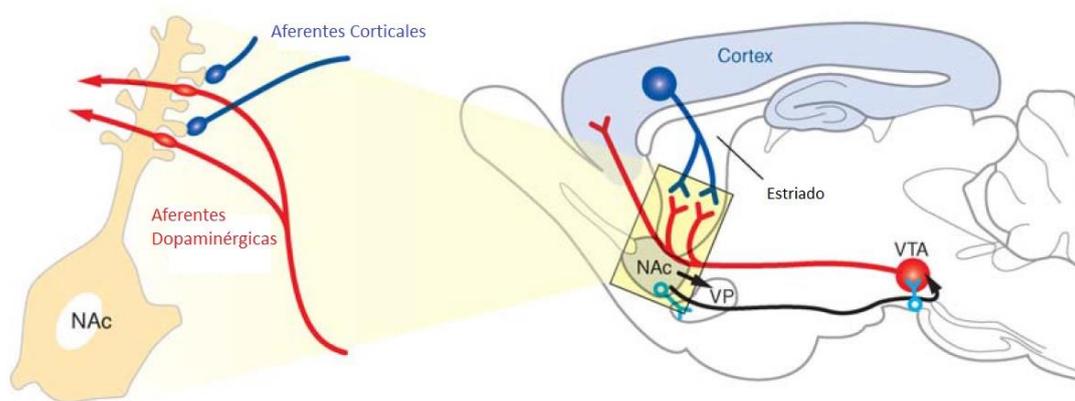


Figura 5. Interacción de Glu y DA en el Estriado. La mayor proporción de células que conforman el NAc son las MSN. Como se observa en el gráfico de la derecha, las aferentes glutamatérgicas de la corteza cerebral y las aferentes dopaminérgicas desde ATV o S Nigra interactúan en las espinas de NAc y del estriado dorsal permitiendo la integración de la información sensorial y motora que proviene de la corteza con la información del estado motivacional del organismo del cerebro medio. Como se observa en el panel de la izquierda las aferentes glutamatérgicas hacen sinapsis en las cabezas de las MSN y las aferentes dopaminérgicas hacen sinapsis en los cuellos de las espinas generando un área de intercambio (Hyman y col, 2006).

SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Dopamina: Neurotransmisor Catecolaminérgico más Importante del SNC.

Participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y afectividad como así también en la comunicación neuroendócrina. Además, se estableció una función muy importante de DA, que es la de ayudar a consolidar el aprendizaje estímulo-respuesta para que los individuos adquieran el hábito de perseguir aquellos estímulos que son reforzantes y necesarios para la supervivencia.

Síntesis, Metabolización y Eliminación

Existen mecanismos que regulan de manera precisa la síntesis y liberación de DA. La síntesis tiene lugar en las terminaciones dopaminérgicas donde se encuentra una alta concentración de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos [(L-DOPA) Freund y col., 1984]. La hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el punto de regulación de la síntesis de catecolaminas en el SNC y en consecuencia la TH es la enzima limitante de la síntesis de DA (Nagatsu y col., 1964; Levitt y col., 1965). Esta enzima adiciona un grupo hidroxilo al aminoácido L-tirosina y forma L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), para esto utiliza como cofactores tetrahidrobiopterina (BH₄), oxígeno e hierro. Luego por la acción de la L-DOPA de aminoácidos aromáticos y piridoxal fosfato se obtiene DA o 3,4-dihidroxifenilalanina.

El principal mecanismo de terminación de la transmisión sináptica de DA ocurre cuando es recaptada por el transportador DAT (transportador de DA) en el SNC (Feldman y col., 1997). Aunque existen enzimas extraneuronales que la catabolizan, como la monoamino-oxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT), la terminación del efecto del neurotransmisor se debe principalmente a la captura del mismo por las propias terminales nerviosas que la liberaron. La estequiometría del intercambio indica que DA es cotransportada al interior de la terminal con 2 iones de Na⁺ y un ion Cl⁻ (Attwell y Mobbs, 1994).

Receptores Dopaminérgicos

Existen dos subtipos de receptores dopaminérgicos acoplados a proteína G y se los denomina receptor dopaminérgico tipo 1 (D₁), que incluye a los D₁ y D₅, y receptor dopaminérgico tipo 2 (D₂), que incluye a los D₂, D₃ y D₄. Los receptores D₁ y D₅ se caracterizan por tener una región carboxilo terminal larga que se acopla a proteína G estimuladora y activa a la enzima adenilato ciclasa conduciendo a la producción de AMPc. En contraste, una estructura inversa con un extremo carboxilo terminal corto, se observa en los receptores D₂, D₃ y D₄ que se acopla a proteínas G inhibitoria, e inhibe la formación de AMPc.

Los receptores tipo D₁ se ubican a nivel postsináptico, la mayoría sobre las MSN gabaérgicas. Los receptores tipo D₂ se encuentran a nivel presináptico sobre la neurona dopaminérgica actuando como auto-receptores (regulan la liberación de DA), también sobre terminales glutamatérgicas y sobre las neuronas MSN.

Rol del sistema Dopaminérgico en la Inducción y Expresión de la Sensibilización

El sistema dopaminérgico es conocido por tener un rol crítico en las propiedades reforzantes de los psicoestimulantes (Wise y Bozarth, 1987; Di Chiara y Imperato, 1988; Koob 1992), y se ha demostrado su participación en la AA de estas drogas (Fibiger y col., 1987; Koob y Bloom, 1988). Datos de nuestro y otros laboratorios, han demostrado que los receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ están involucrados en la inducción de la sensibilización a psicoestimulantes y estrés (Ujike y col., 1989; Vezina y Stewart, 1989; Kuribara y Uchihashi 1993; Diaz-Otañez y col., 1997). Concretamente, el bloqueo de estos receptores por antagonistas farmacológicos dopaminérgicos inyectados antes del estrés bloquearon tanto el aumento de la actividad locomotora por estrés agudo y crónico (Diaz-Otañez y col., 1997), como la preferencia a anfetamina condicionada a un lugar luego de estrés agudo (Capriles y Cancela, 1999).

No se ha podido demostrar hasta el momento la participación de los receptores dopaminérgicos en la expresión de la sensibilización. Si bien la estimulación de los receptores dopaminérgicos en el NAc es necesaria para la expresión de la sensibilización conductual, la estimulación con agonistas farmacológicos parece no ser suficiente para provocar la respuesta conductual. Estudios de expresión de los receptores D₁ y D₂ al menos una semana después del tratamiento repetido con psicoestimulantes, no hallaron cambios consistentes. Estos resultados indican que los receptores dopaminérgicos contribuyen en la expresión a largo plazo de la sensibilización conductual, pero por sí solos no son suficientes para expresar la sensibilización a las drogas (Bonhomme y col., 1995; Claye y col., 1995; Mayfield y col., 1992).

SISTEMA GLUTAMATÉRGICO**Glutamato: Neurotransmisor Excitatorio más Abundante del SNC**

El amino ácido L-glutamato es considerado el mayor mediador excitatorio en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos y está involucrado en la mayoría de los aspectos del funcionamiento normal del cerebro como son los procesos cognitivos de memoria y aprendizaje (Fonnum, 1984; Ottersen y Storm-Mathisen, 1984; Collingridge y Lester, 1989; Headley y Grillner, 1990). El Glu también tiene un rol muy importante en el desarrollo del SNC, que incluye inducción y eliminación de sinapsis, migración de células, diferenciación y muerte neuronal. La mayoría de las neuronas e inclusive las células gliales

tienen receptores para Glu en sus membranas (Hosli y Hosli, 1993; Steinhauser y Gallo, 1996; Vernadakis, 1996; Shelton y McCarthy, 1999; Bergles y col., 2000). Se ha encontrado además, que en los órganos de la periferia y tejidos, como así también en células endócrinas (Moriyama y col., 2000), el Glu tiene rol de señalización.

Glutamato Intracelular y Extracelular

El cerebro contiene gran cantidad de Glu, de 5 a 15 mmol por kg de peso húmedo dependiendo de las áreas (Schousboe, 1981), y para asegurar una adecuada neurotransmisión las concentraciones extracelulares de Glu son estrechamente controladas. La concentración media de Glu en el cerebro es de 10 mM (Kvamme y col., 1985), mientras que en el líquido extracelular es de 2-9 μ M (Baker y col., 2003). Es importante destacar que la distribución del Glu se encuentra en un equilibrio dinámico, altamente sensible a cambios energéticos debido a que el Glu es constantemente liberado de la célula y recaptado del líquido extracelular. La pérdida del equilibrio de la homeostasis y la toxicidad del Glu han sido implicadas en la patogénesis de enfermedades neuronales del sistema nervioso central (SNC), incluyendo isquemia, hipoxias, hipoglucemias (Haddad y Jiang, 1993; Lipton, 1999; Small y col., 1999), Esclerosis Lateral Amiotrófica (Ludolph y Münch, 1999; Shaw, 1999; Spencer, 1999), Alzheimer (Honig y col., 2000), Epilepsia (Meldrum, 1994), como así también en el desarrollo de adicción a drogas (Kalivas, 2009).

Síntesis y Metabolismo del Glutamato

En el cerebro, el Glu es sintetizado en las terminales presinápticas a partir de la glucosa del ciclo de Krebs o de la glutamina de las células gliales, astrocitos, que es liberada al espacio extracelular y transportada al interior de las terminales neuronales donde es convertida en Glu por la enzima mitocondrial glutaminasa. Este transporte de Glu y glutamina (Gln) entre astrocitos y neuronas ha sido propuesto como la mayor vía por la cual el Glu es reciclado y se refiere normalmente como ciclo Glu-Gln. Una vez en la terminal nerviosa, el Glu es cargado en las vesículas por el transportador vesicular (VGLUT) que es una proteína multimérica compleja que funciona con gradiente de protones (Takamori, 2006). Después de la polarización de la membrana presináptica el Glu es liberado al espacio sináptico, mecanismo conocido como liberación vesicular, difunde pasivamente y se une a los receptores glutamatérgicos presinápticos, postsinápticos y peri-sinápticos. Existe otro mecanismo de liberación de Glu conocido como no sináptico (o no vesicular), donde el Glu

es liberado por el intercambiador Cisteína/Glutamato (Cis/Glu). La Gln se encuentra normalmente presente en el líquido extracelular en una concentración de alrededor de 200-500 μM (Gjessing y col., 1972; Hamberger y Nystrom, 1984). La Gln en contraste con el Glu, no es tóxica y no es capaz de activar los receptores glutamatergicos.

Intercambiador Cisteína/Glutamato

El intercambiador Cis/Glu, también conocido con el nombre Xc-, se encuentra predominantemente expresado en células gliales con otros transportadores glutamatergicos gliales. En el NAc Core el 60% del Glu basal extracelular deriva en forma constitutiva del intercambiador Cis/Glu (Baker y col., 2002). Como se observa en la **figura 6**, el intercambiador está compuesto por dos subunidades, una subunidad catalítica de cadena liviana xCT y otra de cadena pesada de glicoproteína (4F2hc). El intercambiador está altamente expresado en el cerebro e incorpora cisteína (Cis-S-S-Cis) que es un precursor en la síntesis de glutatión (GSH), crítico para las respuestas contra estrés oxidativo y detoxificación (Griffith, 1999; Sato y col., 2002). El sistema Xc- regula el medio antioxidante por desplazar el par redox cisteína a un estado más reducido (Cis-SH). La recaptación de cisteína se encuentra relacionada con la liberación de Glu citoplasmático en relación estequiométrica 1:1 (McBean, 2002). Este intercambio entre moléculas no insume gasto energético ni requiere de Na^+ , por lo tanto se denomina Glu Na^+ independiente.

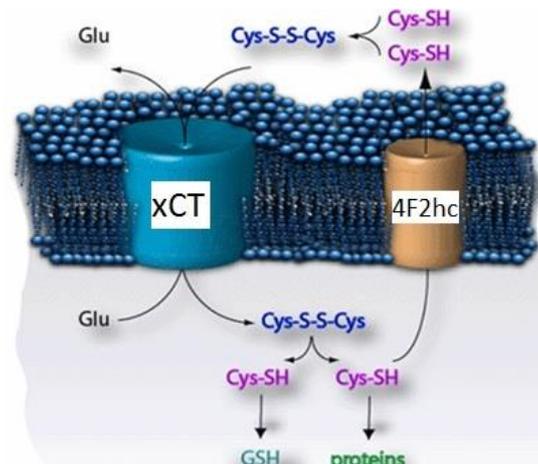


Figura 6. El Sistema Xc- está compuesto por una cadena pesada 4F2hc (4F2 heavy chain) y una cadena liviana, xCT, que se encuentran unidas por un puente disulfuro (no se observa en el gráfico). El sistema Xc- importa una molécula de cisteína (Cis-SS-Cis) en intercambio por una molécula de Glu.

El rol del intercambiador cobra importancia en el estudio de la adicción debido a que se ha demostrado en modelos animales de administración repetida de cocaína y luego de un período de tres semanas de abstinencia, una reducción de los niveles de la subunidad catalítica xCT y de la funcionalidad del intercambiador en el NAc (Knackstedt y col., 2010a); consistentemente los niveles basales extracelulares de Glu medidos por la técnica de microdiálisis, se ven disminuidos en un 50% en NAc Core (Madayag y col., 2007; Pendyam y col., 2009; Knackstedt y col., 2010a). Resultados similares sobre la disminución del xCT y niveles de Glu se obtuvieron con el modelo de administración repetida de nicotina, luego de 12 hs de abstinencia [tiempo al que se observan marcados efectos de abstinencia a nicotina (Knackstedt y col., 2010b)]. Además Baker (2003) demostró utilizando la técnica de microdiálisis asociada con *No Net Flux*, tres semanas después de la administración sistémica de cocaína durante 7 días, una disminución en los niveles de Glu basal en NAc, pero no en CPf o estriado.

Receptores Glutamatérgicos Ionotrópicos y Metabotrópicos

Existen dos grandes familias de receptores glutamatérgicos: **ionotrópicos (iGluRs)**, ligado a canales iónicos (Na^+ y Ca^{++} , menor medida K^+) que median las respuestas excitatorias rápidas, y los **metabotrópicos (mGluRs)** que se encuentran asociados a proteína G y tienen un rol modulador en la transmisión glutamatérgica (Kew y Kemp, 2005).

Los receptores glutamatérgicos **ionotrópicos** tradicionalmente fueron clasificados en tres subtipos basados en datos obtenidos de farmacología y electrofisiología: receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propionato (AMPA) y receptor kainato (KA). Los receptores NMDA se encuentran implicados en múltiples aspectos de la fisiología del cerebro y funciones cognitivas, como memoria y aprendizaje (Bliss y Collingridge, 1993). Son mediadores de plasticidad sináptica, como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) (Massey y col., 2004; Morishita y col., 2007; Berberich y col., 2005; Weitlauf y col., 2005). Los receptores NMDA tienen una alta afinidad por Glu, pero para ser completamente activados necesitan de un co-agonista como glicina o D-serina. Cuando se activan conducen la entrada de Na^+ y principalmente Ca^{++} , para esto la membrana debe estar ya despolarizada para liberar al ión Mg^+ que se encuentra bloqueando el canal del receptor NMDA, y luego se inactivan lentamente. La estructura de los receptores NMDA no es del todo clara, ya que se ha propuesto que puede formar estructuras tetra o pentaméricas (Michaelis EK, 1998). Sin

embargo, lo cierto es que se forman por combinaciones de diferentes subunidades. Específicamente han sido identificadas tres familias de subunidades del receptor NMDA: 1) NR1, 2) NR2A-D, y 3) NR3A-B. El receptor nativo poseería una estructura pentamérica heteróloga conformada por dos copias de la subunidad NR1 (Behe y col., 1995), y al menos dos subtipos de las subunidades NR2 (Monyer y col., 1992; Chazot y col., 1994) que le darían la heterogeneidad funcional (Monyer y col., 1994), por lo tanto, el dímero NR1-NR2 se considera la estructura base de organización funcional. Los receptores NMDA que contienen la subunidad GluNR2B se encuentran presente en estriado y corteza, presentan cinéticas de decaimiento lentas (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004) y una baja probabilidad de apertura comparado con la subunidad GluNR2A (Brigman JL y col., 2010). Los receptores NMDA se encuentran en el espacio sináptico o extrasináptico, y constituyen dos *pooles* funcionales diferentes de receptores. Numerosos estudios han demostrado la distribución preferencial en el espacio extrasináptico, que tiene el receptor NMDA que contiene la subunidad GluNR2B (Papouin y col., 2012; Petralia, 2012).

La mayor parte de la transmisión sináptica excitatoria en el cerebro se encuentra mediada por los receptores AMPA. El tráfico de los receptores AMPA, dentro y fuera de la sinapsis, es un mecanismo importante para regular la fuerza sináptica en numerosos procesos de plasticidad sináptica incluyendo potenciación a largo plazo (LTP), depresión a largo plazo (LTD) y escalamiento sináptico (Malinow y Malenka, 2002; Brecht y Nicoll, 2003; Watt y col., 2004). Los canales de los receptores AMPA se abren por la exposición a Glu pero desensibilizan rápidamente (Trussell y Fischbach, 1989) y tienen baja afinidad por el Glu (Patneau y Mayer, 1990). Los receptores AMPA funcionales son tetrámeros formado por dímeros de dímeros (Mano y Teichberg, 1998; Rosenmund y col., 1998; Greger y Esteban, 2007). Las subunidades que lo conforman son cuatro y se denominan desde GluR1 hasta GluR4 (Collingridge y col., 2009). Independientemente de la composición de subunidades que lo constituyen estos receptores son permeables a Na^+ y K^+ . Sin embargo, cuando la subunidad GluR2 no está presente en el tetrámero, las propiedades del canal cambian y se vuelve permeable a Ca^{++} . Se ha demostrado que la incorporación sináptica de este receptor sin GluR2, es altamente regulada y juega un rol importante en aumentar la fuerza sináptica asociada con numerosas formas de plasticidad (Cull-Candy y col., 2006; Isaac y col., 2007; Liu y Zukin, 2007).

La composición particular del receptor determina las diferentes funciones fisiológicas y propiedades de tráfico de receptores AMPA. En el NAc de animales sin tratamiento, se ha demostrado por estudios de co-inmunoprecipitación que aproximadamente el 90% de los

receptores están constituidos por las subunidades GluR1 asociados con GluR2 o GluR3, aunque GluR1-GluR2 constituyen la principal población. Una menor población de receptores se encuentra constituida por las subunidades GluR2-GluR3, y en menor proporción GluR1 como homómeros. El porcentaje de receptores AMPA sin la subunidad GluR2 en condiciones basales constituye la minoría, un 5-10%, y no contribuye significativamente a la transmisión sináptica (Conrad y col., 2008). Estos datos fueron obtenidos de preparaciones de membranas de NAc de animales sin tratar (Reimers y col., 2011), y resultados similares se obtuvieron de animales que pasaron por la experiencia de autoadministración de salina (Conrad y col., 2008; Boudreau y col., 2007).

Para la inserción la membrana de los receptores AMPA en el espacio sináptico se requiere un esquema de tres pasos: 1) movilización intracelular de vesículas que contienen receptores AMPA a la superficie de la membrana, 2) difusión lateral al sitio sináptico y 3) retención en la sinapsis vía interacción con proteínas de anclaje. Bajo condiciones normales este proceso es altamente dinámico y los receptores AMPA son continuamente intercambiados de la sinapsis a los *pools* de almacenado (Triller y Choquet, 2003; Newpher y Ehlers, 2008; Shepherd y Huganir, 2007). Para asegurar una efectiva transmisión sináptica, los receptores AMPA se encuentran anclados en la densidad postsináptica (PSD) observada como matriz densa, formada principalmente por actina, debajo de la membrana en la cual se encuentran los conglomerados de receptores glutamatérgicos, proteínas de anclaje y elementos del citoesqueleto (Lisman y Raghavachari, 2006; Newpher y Ehlers, 2008; Okabe, 2007). La composición de las subunidades también confiere reglas en el tráfico y difusión de los receptores. Se ha determinado que la inserción en la membrana sináptica de los receptores GluR1-GluR2 ocurre de forma dependiente de la actividad, mientras que GluR2-GluR3 ciclan constitutivamente dentro y fuera de la sinapsis (Malinow, 2003). Las diferencias en la regulación de la fosforilación e interacción con otras proteínas se debe a la longitud de los extremos C-terminales de las subunidades, GluR1 contiene extremo C-terminal largo y GluR2 y GluR3 contienen extremos C-terminales cortos (Song y Huganir, 2002; Derkach, 2007). El número de receptores AMPA en la sinapsis no es fijo, varía de acuerdo a desarrollo sináptico y actividad, por esto se ha relacionado a los receptores AMPA con la fuerza sináptica (Lisman y Raghavachari, 2006; Newpher y Ehlers, 2008).

La familia de receptores **metabotrópicos** se encuentran asociados a proteína G estimuladora o inhibitoria. Existen 8 tipos diferentes de receptores mGluR y se denominan desde el mGluR1-mGluR8 y se encuentran subdivididos en tres grupos de acuerdo con la estructura, homología en la secuencia, propiedades farmacológicas y transducción de señales

(Pin y Duvoisin, 1995; Ferraguti y Shigemoto, 2006). El Grupo I está compuesto por los receptores mGluR1 y mGluR5, se encuentran acoplados a la enzima fosfolipasa C y de este modo aumentan la producción de inositol trifosfato y diacilglicerol. En general la activación de estos receptores llevan a la excitabilidad neuronal vía activación de los receptores iGluR (Cartmell y col., 2000; Ferraguti y Shigemoto, 2006). El Grupo II se compone de los receptores mGluR2 y mGluR3, y el Grupo III se compone de los receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8, ambos grupos se encuentran se acoplados a proteínas G inhibitoria e inhiben la formación de AMPc (Malherbe y col., 1999). La activación de ambos grupos de receptores modulan negativamente la liberación sináptica de Glu (Olive, 2009).

Utilizando el bloqueo farmacológico de los receptores metabotrópicos en diferentes especies animales, se ha demostrado que estos juegan un papel vital para la inducción y el mantenimiento del LTP. Los receptores mGluR1 están localizados principalmente en la neurona postsináptica en la perisinápsis, pero cerca del espacio sináptico en las dendritas, soma y espinas; sin embargo algunos sugieren que podrían estar en la presinapsis también (Ottersen y Landsend, 1997; Cartmell y col., 2000). La activación de estos receptores al estimular fosfolipasa C, lleva a la liberación de Ca^{++} de las fuentes internas, estimula a la proteína quinasa C que potencia canales de Ca^{++} voltajes dependientes tipo-L y disminuye la conductancia de los canales de K^+ generando repolarización lenta (Francesconi y Duvoisin, 2000; Lesage y Steckler, 2010). Los mGluR2 y mGluR3 se encuentran principalmente ubicados en las neuronas presinápticas glutamatérgicas donde actúan como auto-receptores inhibitorios; sin embargo también se los han encontrado expresado en la membrana postsináptica. El mecanismo por el cual median sus propiedades inhibitorias se debe a la potenciación de los canales de K^+ presinápticos, suprimiendo los canales de Ca^{++} voltaje dependientes que tienen influencia directa sobre la liberación de neurotransmisores (Conn y Pin, 1997; Kew y Kemp, 2005; Ferraguti y Shigemoto, 2006). El grupo III se encuentran predominantemente en neuronas presinápticas como auto-receptores, suprimiendo la transmisión excitatoria (Ohishi y col., 1995; Conn y Pin, 1997); sin embargo también se los ha encontrado en algunas células gliales.

Rol de los Receptores AMPA en la Expresión de la Sensibilización

El aumento en la expresión de superficie de los receptores AMPA en NAc y su relación con el fenómeno de sensibilización fue primeramente observado en el modelo de sensibilización conductual inducido por la exposición previa a dosis repetidas de cocaína.

Pennartz (y col, 1994) y Hu y White, (1996) comenzaron a describir la activación de las MSN de NAc por la llegada de vías aferentes glutamatérgicas, cuyos efectos están primariamente mediados por la estimulación postsináptica de los receptores AMPA. Luego, debido a la aparición de agonistas y antagonistas potentes y selectivos como CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona) y NBQX (6-nitro-7-sulfomobezo quinoxalina-2,3-diona), se evidenció el rol de los receptores AMPA mediante la realización de experimentos farmacológicos. Así, se observó la expresión de la sensibilización cruzada a efectos estimulantes motores luego de microinyecciones de agonista AMPA administradas en NAc Core, pero no en Shell, en animales que previamente fueron sensibilizados por la administración crónica de cocaína (Pierce y col., 1996; Bell y col., 2000). Consistentemente, la expresión del fenómeno de sensibilización a cocaína inducida por un tratamiento repetido de la droga fue suprimida por la administración del antagonista CNQX en NAc Core antes de la administración de la dosis desafío de cocaína sistémica (Pierce y col., 1996).

Estudios utilizando ensayos de proteínas de entrecruzamiento, que distinguen proteínas de la superficie de aquellas de depósitos intracelulares, demostraron que luego del tratamiento con dosis repetidas de cocaína se observa un aumento en la expresión de superficie de la subunidad GluR1 del receptor AMPA en el NAc de animales que desarrollaron sensibilización (Boudreau y Wolf, 2005). Mientras que en aquellos animales en los que no se evidenció este fenómeno, no hubo un aumento de GluR1 en la superficie de la membrana (Boudreau y Wolf, 2005). Esto fue demostrado a los 7, 14 y 21 días después de la última inyección de cocaína, aunque 24 h después de la última inyección este efecto no fue observado (Boudreau y Wolf 2005; Boudreau y col., 2007, 2009). En estudios más recientes utilizando dosis más altas de cocaína con el objetivo que todos los animales desarrollen sensibilización, se encontró un aumento en la relación de superficie/total de los receptores AMPA al día 14 después de la última inyección de la droga (Wolf y Ferrario, 2010). Del mismo modo, utilizando otra técnica donde se cuantificó las subunidades del receptor AMPA en la fracción de membrana sinaptosomal (terminaciones nerviosas o botones sinápticos), se encontró en animales previamente sensibilizados un aumento de las subunidades GluR1 y GluR2 del receptor AMPA preparado a partir del NAc extraído a los 21 días, pero no 24 hs después de la última inyección de cocaína (Schumann y Yaka, 2009). Evidencias similares también se obtuvieron con estudios de electrofisiología donde se encontró un aumento en la relación de las corrientes AMPA/NMDA en NAc Shell y Core de animales previamente sensibilizados al tratamiento repetido de cocaína, 14-21 días después de la última inyección de cocaína (Kourrich y col., 2007, Moussawi y col., 2011).

Por otro lado, en la literatura disponible se reportó que el tratamiento repetido a diferentes drogas de abuso (anfetamina, cocaína, nicotina, morfina) altera la morfología de las dendritas y las espinas dendríticas en las regiones del cerebro asociadas con propiedades incentivo-motivacionales y reforzantes como el NAc, CPu y CPfr (Robinson y Kolb, 2004). Interesantemente, se demostró por la técnica de marcación DiI (colorante lipofílico que permite ver la morfología de las espinas) y electrofisiología en animales con administración repetida de cocaína, un aumento en el tamaño de las cabezas de las espinas de las MSN de NAc Core que se relacionó con el aumento en la relación de las corrientes AMPA/NMDA (aumento de la fuerza sináptica), a expensas del aumento de la expresión de los receptores AMPA (Gipson y col., 2013).

Es interesante remarcar, que estudios de nuestro laboratorio demostraron que neuroadaptaciones similares en el NAc contribuyen a la expresión de la sensibilización conductual inducida por estrés crónico de 7 días y una dosis aguda de cocaína. En el modelo de sensibilización cruzada estrés-cocaína, se demostró un aumento de la subunidad GluR1 en la expresión de superficie de NAc (preferentemente Core), que se correlacionó positivamente con un aumento del tamaño de la PSD y de la dinámica de actina, así como del número de espinas maduras en NAc Core, pero no así en Shell (Esparza y col., 2012, Esparza datos no publicados). Interesantemente, la expresión de la sensibilización conductual en este modelo de sensibilización cruzada estrés-cocaína fue bloqueado cuando se microinyectó en NAc Core una dosis de CNQX o de Latrunculina A (despolimerizante de actina), previo a la inyección aguda de cocaína tres semanas después del estrés repetido por inmovilización. Además, cuando se evaluó la expresión de superficie del receptor AMPA en NAc luego de la microinyección intra-Core de Latrunculina en animales previamente estresados, no se encontraron cambios respecto del control. Estos resultados indicaron que es necesaria la integridad del citoesqueleto en la expresión de superficie de los receptores AMPA, y que estos receptores constituyen una de las neuroadaptaciones que subyacen a la expresión de la sensibilización conductual inducida por estrés (Esparza y col., 2012) y drogas (Pierce y col., 1996).

Rol de los Receptores NMDA en la Expresión de la Sensibilización

Como ya se ha descrito, la neurotransmisión glutamatérgica juega un rol crítico en la sensibilización y, a diferencia del rol de los receptores AMPA en la expresión de este fenómeno, numerosos estudios han implicado a los receptores glutamatérgicos del tipo

NMDA en la inducción o desarrollo del fenómeno de sensibilización. Mediante la utilización de un antagonista no competitivo de los receptores NMDA, MK 801, co-administrado junto con anfetamina, cocaína o morfina, se previno el desarrollo de sensibilización a corto plazo (Karler y col., 1989, 1990, 1991) o a largo plazo luego de 7-10 días de abstinencia (Wolf y Jeziorski, 1993). Más aun, utilizando antagonistas de los receptores NMDA, MK-801 o CGS 19755, co-administrados con anfetamina, se previno la inducción de sensibilización conductual de estereotipía y los cambios celulares en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que normalmente acompañan el desarrollo de la sensibilización conductual (Wolf y col., 1995). Sin embargo, los antagonistas NMDA (ácido carboxipiperasin-4-yl-propil-1-fosfórico) CPP, MK-801 y CGS 19755, no bloquean la expresión de la sensibilización conductual a anfetamina cuando son inyectados 30 min antes de la dosis desafío de anfetamina (Karler y col., 1991; Wolf y col., 1995).

Aportes de nuestro laboratorio también demostraron que animales inyectados con MK-801 de forma sistémica antes de la sesión de estrés, no desarrollan de sensibilización conductual y neuroquímica dopaminérgica en NAc Core y Shell a anfetamina a las 24 hs después del estrés, y en Core 8 días después del estrés (Pacchioni y col., 2002, 2007). Por otro lado, también se demostró que la inyección sistémica de MK-801 previo a la sesión de estrés por inmovilización impidió el desarrollo de sensibilización conductual y el aumento de las propiedades reforzantes a morfina (del Rosario Capriles y col., 2002).

Respecto a la expresión de superficie en NAc de las subunidades del receptor NMDA los hallazgos son contradictorios, algunos estudios no mostraron cambios y otros evidenciaron un aumento en la expresión de la subunidad GluNR1 del receptor NMDA al día 1 de abstinencia luego del tratamiento crónico de cocaína (Lu y col., 2003; Self y Choi, 2004; Conrad y col., 2008). Estudios de autoradiografía en NAc Core y Shell también fallaron al intentar demostrar alteraciones en la expresión del receptor NMDA por autoadministración de cocaína de acceso corto (1 h de acceso a cocaína) o de acceso extendido (6 hs) luego de 14 o 60 días de abstinencia (Ben-Shahar y col., 2007). Sin embargo, Schuman y Yaka (2009) demostraron que inyecciones no contingentes de cocaína crónica aumentaron las subunidades GluNR1, GluNR2A y GluNR2B a los 21 días después de abstinencia a cocaína, pero no a las 24 hs, en el NAc de animales sensibilizados. Estudios más recientes sobre exposición crónica a nicotina demostraron aumento de las subunidades GluNR2A y GluNR2B en el NAc Core de animales sin período de abstinencia (Gipson y col., 2013) y el bloqueo de este receptor previno la recaída en la búsqueda de nicotina. Shen y col. (2011) demostraron resultados similares con un tratamiento repetido de heroína.

Transportadores Glutamatérgicos

Debido a que el exceso de Glu extracelular puede llevar a neurotoxicidad, existen transportadores de Glu de alta afinidad expresados en células gliales y neuronas para remover el Glu libre del espacio sináptico y controlar los niveles extracelulares de Glu (Danbolt, 2001). Los transportadores dependientes de Na^+/K^+ de alta afinidad por Glu y aspartato constituyen una familia de transportadores *solute carrier 1* (SLC1) y se encuentran conformados por 5 miembros EAAT1/GLAST, EAAT2/GLT-1 y EAAT3-5 (transportadores de amino ácidos excitatorios, EAAT, **figura 7**) (Danbolt, 2001; Kanai y Hediger, 2004; Beart y O'Shea, 2007). GLAST y GLT-1 se expresan predominantemente en astrocitos, se encuentran con sus procesos rodeando las sinapsis glutamatérgicas donde son los responsables de remover inmediatamente el 90% del Glu liberado en el cerebro de mamíferos (Rothstein, 1995, 1996; Danbolt, 2001; Mitani y Tanaka, 2003). Mientras que los EAAT3-5 tienen una distribución anatómica diferente en las neuronas (Amara y Fontana, 2002). El transportador GLT-1 está presente en la mayoría (si no en todos) los astrocitos de la neocorteza, estriado y tálamo, así como en los astrocitos de la materia blanca (Lehre y col., 1995). EAAT mantienen un control riguroso sobre la señal glutamatérgica sináptica, para limitar el daño por excitotoxicidad pero también de la activación sostenida de receptores glutamatérgicos iGluR y mGluR (Bergles y col. 1999).

El transportador GLT-1 es necesario para la transmisión excitatoria glutamatérgica normal, su disminución podría ser uno de los causales de las disfunciones neurológicas y enfermedades neurodegenerativas asociadas al Glu (Rothstein, 1995; Ye y col., 1999; Rao y col., 2001; Sepkuty y col., 2002), como así también ha sido implicado en la recaída y compulsión de búsqueda de droga (Kalivas, 2009). Específicamente, se ha demostrado una disminuida expresión de GLT-1 en modelos animales con historia previa de AA de cocaína, nicotina y heroína, en estructuras relacionadas con los efectos reforzantes de las drogas como el NAc Core (Knackstedt y col., 2010, 2012; Gipson y col., 2013; Shen y col., 2011), disminución que lleva a una alteración en la homeostasis glutamatérgica (Knackstedt y col., 2010; Trantham-Davidson y col., 2012; Gipson y col., 2013). En un trabajo donde los animales tenían acceso corto o extendido a AA de cocaína se observó una disminución de GLT-1 en Core y Shell dependiente del acceso a la droga, siendo en la subestructura de Core el cambio más evidente (Fischer-Smith y col., 2012).

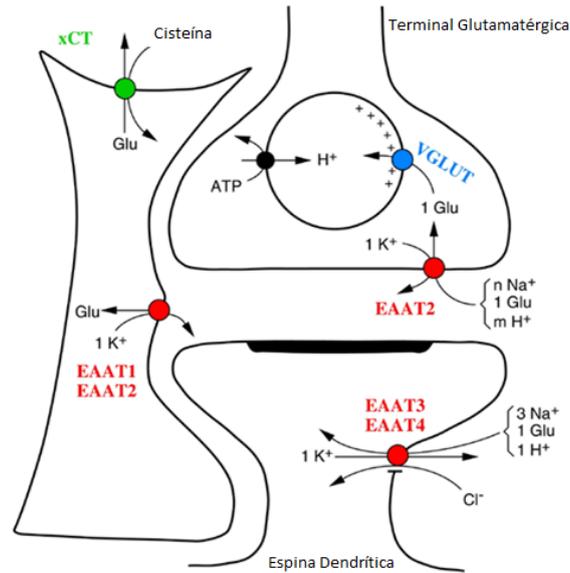


Figura 7. Representación esquemática de la localización celular de los transportadores de Glu en neuronas y células gliales. Los transportadores identificados poseen diferente localización regional y celular. EAAT1 se encuentra expresado en la glía de todo el cerebro, particularmente cerebelo. EAAT2 se encuentra predominantemente en las células gliales, más específicamente astrocitos y microglía. EAAT3 es un transportador neuronal, expresado en todo el sistema nervioso central (SNC) y ubicado post-sinápticamente. EAAT4 transportador post-sináptico ubicado en células de Purkinje de cerebelo. EAAT5 se encuentra solo en retina. Estos transportadores co-transportan 2 o 3 moléculas de Na^+ y un H^+ con cada molécula de Glu o Aspartato y en contra-transporte un K^+ .

Homeostasis Glutamatergica

La homeostasis glutamatergica implica la regulación de los niveles de Glu extracelular en los espacios sinápticos y peri-sinápticos del ambiente extracelular. La homeostasis afecta la actividad sináptica y plasticidad, debido a que controla el acceso de Glu a los receptores iGluRs y mGluRs. Un factor crucial en el mantenimiento de la homeostasis glutamatergica es el balance entre la liberación y eliminación del Glu glial, y sináptico (**figura 8**).

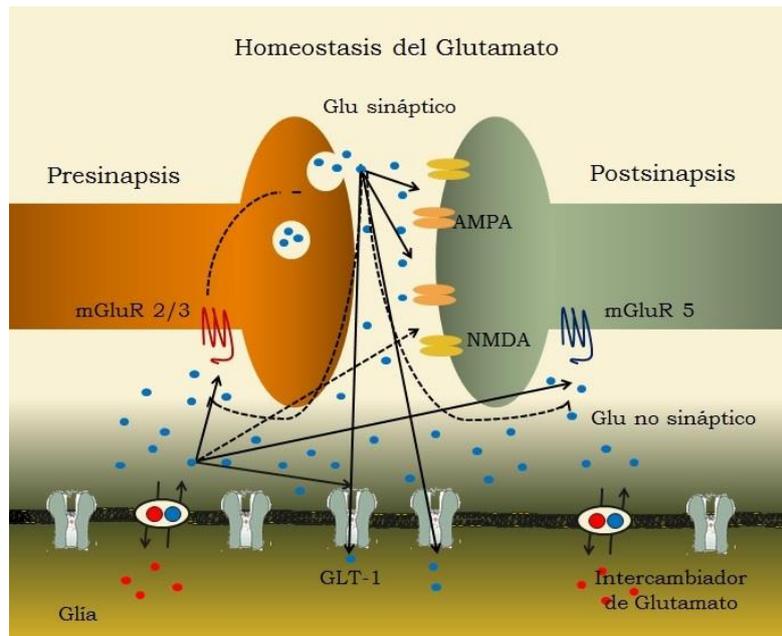


Figura 8. Homeostasis Glutamatérgica en NAc. Recaptación de Glu a través del transportador GLT-1, limita el acceso del Glu sináptico al espacio perisináptico y los receptores mGluRs. Además, limita el acceso de Glu no sináptico al espacio sináptico y a los receptores iGluRs. Como resultado, el Glu que proviene del intercambiador no estimula directamente los iGluRs. Las líneas sólidas representan las interacciones fisiológicas bajo condiciones basales, las líneas de punto representan las interacciones menores. (Kalivas, 2009).

A partir de estudios “*in vitro*” e “*in vivo*” de electrofisiología y microdiálisis se demostró que existe un complejo ambiente regulatorio en el cual el Glu no sináptico puede modular la transmisión excitatoria sináptica y la plasticidad. En estudios de los años 90 (Timmerman y Westerick, 1997), se evidenció que los niveles de Glu extrasináptico no se modificaban utilizando fármacos antagonistas que bloquearan los canales de Ca^{++} y Na^{+} (necesarios para la liberación del neurotransmisor), por lo tanto este provenía de una fuente diferente de la sináptica. El hecho de que se han medido concentraciones altas de Glu extracelular (o no sináptico) de entre 1 y 5 μM , reveló importantes influencias fisiológicas en la transmisión glutamatérgica: el Glu extracelular deriva principalmente de fuentes no sinápticas gliales, los receptores mGluR ubicados en la perisinápsis son activados por el Glu no sináptico y la recaptación de Glu no sináptico protege a los receptores iGluR del espacio sináptico y a la inversa, la recaptación del Glu sináptico de no activar los receptores mGluR perisinápticos (Barbour, 2001; Warr y col., 1999; Haydon, 2001). Existe numerosa evidencia que indica que estas funciones fisiológicas se encuentran alteradas en modelos animales de administración repetida de cocaína, heroína y nicotina como se detallará a continuación.

Alteración de la Homeostasis de Glutamato en la Expresión de la Sensibilización y Cambios Neuroadaptativos.

En modelos de administración repetida de cocaína, heroína y nicotina se ha demostrado que la expresión de la subunidad xCT del intercambiador se encuentra disminuida, por lo tanto los niveles basales de Glu extracelular se encuentran reducidos y como consecuencia el tono inhibitorio (que regula la liberación de Glu sináptico) debido a la poca activación de los mGluR2/3 se encuentra también disminuido (Gipson y col., 2013; Shen y col., 2011; Knackted y col., 2009). Estos animales frente a una situación de reinstalación de la conducta de búsqueda inducida por estrés, por droga (cocaína, anfetamina, nicotina, heroína), o claves asociadas previamente al consumo de la droga han demostrado responder con una mayor liberación sináptica de Glu en NAc Core que proviene de la CPf dorsal o prelímbica (McFarland y col., 2004, 2003; Madayag y col., 2007; LaLumiere y Kalivas, 2008; Stefanick y col., 2013; Gipson y col., 2013). Recordando además, que dado que los niveles del transportador glutamatérgico GLT-1 se encuentran disminuidos, el desborde de Glu sináptico (*spillover*) que se produce durante la recaída en la búsqueda de droga no solo se debe al aumento en la liberación de Glu sináptico sino también a una recaptación disminuida. Además, la liberación de Glu sináptico evocado por la búsqueda de droga se ha asociado con cambios rápidos en la morfología de las espinas sinápticas y en el contenido de proteínas dentro de los 45 min luego de la inyección aguda de cocaína, por ejemplo, el aumento en la expresión del número de receptores AMPA insertados en la membrana correlacionado positivamente con el aumento en el tamaño de la cabeza de la espina en el NAc Core (Shen y col., 2009; Anderson y col., 2008; Toda y col., 2006). Sin embargo, 120 min después de la inyección de cocaína cuando los niveles extracelulares de Glu no se encuentran ya aumentados, el tamaño de la cabeza de la espina se encontró disminuido. Consistente con la disminución en la expresión de los receptores AMPA de superficie, una disminución en la relación de las corrientes AMPA/NMDA fue observada 6 o 24 hs luego de la inyección aguda de cocaína en animales que recibieron previamente un tratamiento crónico de cocaína de forma no contingente (Shen y col., 2009; Boudreaw y col., 2007; Kourrich y col., 2007; Thomas y col., 2001). De esta forma se ha propuesto como uno de los mecanismos que subyacen a la recaída y búsqueda de droga, a la pérdida la homeostasis glutamatérgica que perjudica la regulación del circuito de CPf dorsal hacia el estriado y lleva a neuroadaptaciones en el NAc (Kalivas, 2009).

Herramientas Terapéuticas para Restablecer la Homeostasis

Considerando el rol que tiene la homeostasis de Glu en NAc Core en el modelo de recaída y de compulsión por búsqueda de cocaína (Mc Farland y col., 2003), como así también en la expresión de la sensibilización a psicoestimulantes como anfetamina y cocaína (Pierce y col., 1996), se han utilizado dos herramientas farmacológicas para el restablecimiento de la homeostasis glutamatérgicas y revertir ambos procesos.

El primero de los fármacos utilizados es la N-acetil-cisteína, cuyo mecanismo de acción consiste en restaurar la función de la subunidad catalítica α CT por aumentar la concentración extracelular de cisteína, aumentando la concentración extracelular de Glu en NAc y reestableciendo la señalización a partir de los receptores metabotrópicos pre y postsinápticos mGluR2/3 con una disminución de la probabilidad de liberación de Glu sináptico frente a una dosis aguda de cocaína (Moran y col., 2005). Diferentes autores han demostrado además su eficiencia en atenuar la recaída en un modelo animal de búsqueda de cocaína (Moussawi y col., 2009; Backer y col., 2003; Madayag y col., 2007). Es importante destacar que debido a que es un fármaco ya aprobado y utilizado como antioxidante, fue utilizado también en humanos en los cuales se ha demostrado una disminución en la reactividad por claves a cocaína en individuos con historia de consumo de cocaína previa (LaRowe y col., 2007). Otro fármaco también utilizado para restablecer la homeostasis glutamatérgica es Ceftriaxona, un antibiótico β -lactámico, el cual se ha demostrado que aumenta la expresión y funcionalidad del transportador GLT-1 por activación del factor $\text{NF}\kappa\beta$ que aumenta la transcripción para GLT-1. Por lo tanto, frente a un aumento de Glu basal y sináptico como consecuencia de una inyección aguda de cocaína en animales previamente sensibilizados a anfetamina, la previa administración de Ceftriaxona restablece la captación del Glu desbordado (*spillover*) (Rasmussen y col., 2011). Investigaciones sobre la eficacia de Ceftriaxona en el transcurso del tiempo encontraron que hay un aumento en la expresión de GLT-1 a partir del tercer día de administración diaria repetida, siendo el pico de expresión a partir del día cinco (Chu y col., 2007). La dosis efectiva de Ceftriaxona que disminuye de forma persistente el Glu extracelular, propuesta por Rasmussen (2011), es de 200 mg/kg i.p. y es una dosis estándar utilizada por otros laboratorios para investigar el rol de la homeostasis glutamatérgica en la adicción a drogas (Rothstein y col., 2005; Miller y col., 2008; Rawls y col., 2010a, b; Knackstedt y col., 2010). El nivel de actividad y de eficacia de las drogas de abuso es provista por datos que demuestran que la administración repetida de Ceftriaxona inhibe tanto el desarrollo de tolerancia a morfina como la dependencia física, además de

prevenir la recaída a la búsqueda de cocaína en ratas (Rawls y col., 2010; Knackstedt y col., 2010; Sari y col., 2009). Ceftriaxona también inhibió la abstinencia a anfetamina y cocaína en un modelo de invertebrados (Rawls y col., 2008).

Resumiendo, la sensibilización conductual o psicomotora hace referencia a un aumento progresivo y duradero de las respuestas conductuales específicas que ocurren durante la administración aguda o repetida de psicoestimulantes y que se extiende también a la influencia de situaciones de estrés agudo o crónico sobre la acción de psicoestimulantes. Se ha demostrado que el estrés incrementa la actividad de los circuitos neurobiológicos dopaminérgicos implicados en la motivación y recompensa. Más específicamente, en las neuronas mesencefálicas las cuales proyectan rostralmente desde ATV hacia NAc y regiones corticales en estrecha relación con el sistema glutamatérgico que proyecta desde CPf y Amígdala hacia NAc, parecen ser los sustratos neurobiológicos activados durante eventos estresantes. La sensibilización es un mecanismo común disparado por estrés y drogas en las sinapsis excitatorias de neuronas dopaminérgicas y se sugiere que la sensibilización conductual es un ejemplo de plasticidad dependiente de la experiencia que involucra plasticidad en las sinapsis glutamatérgicas. De esta forma se ha propuesto que el estrés y el consumo de drogas comparten sustratos neuronales comunes.

A pesar de la extensa literatura que detalla las contribuciones de estos circuitos comunes en el proceso de adicción aún se desconoce la influencia del estrés sobre la acción de cocaína en la neurotransmisión glutamatérgica de neuronas presinápticas y postsinápticas de forma diferencial en el NAc Core y Shell, y la interacción con el sistema dopaminérgico en esta estructura. En este marco, proponemos que existen mecanismos comunes e intercambiables al impacto del estrés y drogas de abuso, responsables de la influencia proactiva del estrés sobre la acción de psicoestimulantes.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La exposición a situaciones de estrés agudo de inmovilización produce neuroadaptaciones en NAc similares a las observadas luego del tratamiento repetido de cocaína. Estas neuroadaptaciones median la expresión de la sensibilización cruzada a los efectos estimulantes de cocaína, e incluyen la desregulación de la homeostasis glutamatérgica, reflejada en cambios en los niveles basales y en la liberación sináptica de Glu, que impacta sobre neuronas postsinápticas de NAc de forma diferencial en Core respecto de Shell, el aumento en la expresión de receptores AMPA y la modulación de la transmisión y liberación de DA en NAc Core. La presente hipótesis plantea que las neuroadaptaciones inducidas por estrés agudo en el sistema glutamatérgico y su interacción con el dopaminérgico en NAc Core tienen un rol crítico en la expresión de la sensibilización cruzada a los efectos estimulantes de cocaína.

OBJETIVO GENERAL

La experiencia de situaciones traumáticas en la vida, no es sólo un factor de riesgo en el desarrollo de la adicción, sino también un disparador para la reincidencia al uso de drogas (Dewart y col., 2007; Ouimette y col., 2007). Estudios clínicos en los años 90 demostraron la influencia facilitadora del estrés atribuida al abuso de drogas, específicamente, la hipótesis de consumo de drogas en respuesta al estrés (O'Doherty, 1991). En apoyo de estos estudios preclínicos, se ha utilizado modelos animales bajo la conducta de adquisición de AA y se demostró una interacción facilitadora entre la exposición a estrés y esta conducta (Piazza y col., 1990; Boyson y col., 2011).

En apoyo de estas observaciones, se ha demostrado que el tratamiento agudo o repetido con psicoestimulantes (Vanderschuren y col., 1999; Pierce y col., 1996) así como la aplicación de estresores de forma aguda o crónica (Stewart y Kalivas, 1991; Robinson, 1985, Lu y col., 2003) induce cambios a largo plazo en la sensibilización conductual y neuroquímica tanto en el desarrollo como en la expresión de la sensibilización. Específicamente, se ha demostrado que el estrés agudo o crónico aumenta la transmisión sináptica dopaminérgica en el circuito mesocorticolímbico, como así también el efecto estimulante en la actividad locomotora (Lu y col., 2003; Yap y Miczek, 2008) y los efectos reforzantes de cocaína y otras drogas adictivas (Lett, 1989; Capriles y Cancela, 1999, 2002). Particularmente, el estrés aumenta la liberación de CRF en ATV y aumenta la respuesta de

neuronas dopaminérgicas frente a eferentes de neuronas glutamatérgicas (Saal y col., 2003; Ungless y col., 2003; Wang y col., 2005). Estas adaptaciones en la transmisión glutamatérgica de ATV por estrés median cambios permanentes en la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica del NAc (Kalivas y Stewart, 1991; Mameli y col., 2009). Como se mencionó anteriormente, el NAc es una estructura heterogénea que puede ser separada histológicamente en dos sub-estructuras Core y Shell (Pennartz y col., 1994). La liberación de DA en Core o Shell es diferencial y depende de la droga de abuso en cuestión (Di Chiara, 2002). Ha sido demostrado el rol crítico de la liberación de Glu en Core en la expresión de la sensibilización conductual luego de una inyección aguda de cocaína (Pierce y col., 1996, McFarland y col, 2003, Stefanick y col, 2013). A pesar de que el rol de la transmisión glutamatérgica en NAc, Core y Shell, está bien caracterizado en algunos aspectos conductuales inducidos por la administración crónica no contingente o por AA de cocaína, la participación del sistema glutamatérgico y la interacción con el sistema dopaminérgico, en el aumento a largo plazo del efecto estimulante y reforzante de cocaína, sobre la actividad motora producida por estrés (una sola sesión de estrés por inmovilización) no ha sido bien caracterizada aún.

Es por ello que el presente estudio tiene como objetivo general identificar la participación de la liberación y homeostasis de Glu, y la interacción con el sistema dopaminérgico en el NAc en la expresión de la sensibilización a cocaína a largo plazo inducida por una sola sesión de estrés agudo por inmovilización mediante estudios conductuales, bioquímicos y electrofisiológicos. El principal objeto de estudio es determinar los cambios plásticos inducidos por una sola sesión de estrés en la postsinápsis glutamatérgica como la expresión de superficie del receptor AMPA, el rol en la liberación y homeostasis de Glu en interacción con la presinápsis dopaminérgica en el NAc Core y Shell, y su relevancia en la expresión de la sensibilización a cocaína inducida por estrés por inmovilización.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS**1. Determinar la Influencia de la Exposición a Estrés Agudo por Inmovilización Sobre los Efectos Estimulantes Motores de Cocaína y Liberación de DA en NAc Core y Shell.**

Numerosas evidencias de nuestro laboratorio han demostrado que la exposición a una o varias sesiones de estrés por inmovilización inducen cambios a largo plazo que llevan a la expresión del fenómeno de sensibilización cruzada a los efectos estimulantes de anfetamina sobre la actividad motora y la liberación de DA en NAc Core y Shell (Pachionni y col., 2002, 2007). Estudios más recientes de nuestro laboratorio demostraron la persistencia del fenómeno de sensibilización cruzada a los efectos estimulantes motores de anfetamina a los 7 días luego de la exposición a estrés agudo por inmovilización (Pachionni y col., 2007).

Además, considerando que el NAc tiene una característica única de doble inervación dopaminérgica y glutamatérgica de espinas individuales, así como, una interacción de DA-Glu preferencial en NAc Core, respecto de Shell, es interesante remarcar que esta estructura fue implicada en el desarrollo como la expresión de la sensibilización inducida por drogas (Pierce y Kalivas, 1997; Wolf, 1998) y por estrés (Pacchioni y col., 2007; Esparza y col., 2012). Este objetivo propone evaluar tres semanas después de la sesión de estrés por inmovilización el efecto estimulante de dosis crecientes de cocaína (0–15 mg/kg i.p.) en la actividad locomotora y evaluar el efecto diferencial estimulante de cocaína (15 mg/kg i.p.) sobre la liberación de DA en NAc Core y Shell.

2. Determinar la Influencia de la Exposición a Estrés Agudo por Inmovilización Sobre la Expresión de Superficie de Receptores AMPA en Membranas de NAc, así como el Rol Funcional de los Receptores AMPA, en la Expresión de la Sensibilización Cruzada sobre las Propiedades Estimulantes de Cocaína (15 mg/ kg) en la Actividad Motora y la Liberación de DA en NAc Core y Shell.

Estudios previos evidenciaron el rol de los receptores AMPA en modelos de sensibilización a drogas de abuso, mediante la realización de experimentos farmacológicos con agonistas y antagonistas de los receptores AMPA. Así, se observó la expresión de la sensibilización cruzada a efectos estimulantes motores luego de microinyecciones del agonista AMPA administradas en NAc Core, pero no en Shell, en animales que previamente recibieron un tratamiento crónico de cocaína (Pierce y col., 1996, Bell y col., 2000).

Consistentemente, la expresión del fenómeno de sensibilización conductual y neuroquímica a cocaína inducida por un tratamiento repetido de la droga fue suprimida por la administración de un antagonista del receptor AMPA, CNQX, en NAc Core antes de la administración de la dosis desafío de cocaína (Pierce y col., 1996; Choi y col., 2005).

Estudios que permiten distinguir proteínas de superficie de aquellas de depósitos intracelulares, demostraron que luego del tratamiento con dosis repetidas de cocaína se observa un aumento de la expresión de superficie de membrana de la subunidad GluR1 del receptor AMPA a los 7, 14 y 21 días después de la última inyección de cocaína (Boudreau y Wolf, 2005; Boudreau y col., 2007, 2009) en NAc de animales que desarrollan sensibilización, mientras que cuando este fenómeno no se evidenció, no hubo un aumento de receptores AMPA en la superficie de la membrana.

Tomados en conjunto estos antecedentes y los de nuestro laboratorio, demuestran que la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por exposición a estrés crónico de inmovilización tres semanas antes, es revertida por la microinyección del antagonista CNQX en el NAc Core antes de la inyección aguda de cocaína (Esparza y col., 2012). Asimismo, en ese modelo de sensibilización cruzada estrés-cocaína se encontró un aumento en la expresión de superficie del receptor AMPA en NAc tres semanas después del estrés repetido. Por lo tanto en este objetivo se propone evaluar el rol funcional de los receptores AMPA en la expresión de la sensibilización conductual a las propiedades estimulantes de cocaína en la actividad motora y la liberación de DA en NAc, utilizando agonistas y antagonistas farmacológicos como AMPA y CNQX (antagonista de los receptores AMPA), diferenciando Core y Shell tres semanas después del estrés por inmovilización. Además, nos proponemos evaluar la expresión de superficie de los receptores AMPA en el modelo de sensibilización cruzada estrés-cocaína, utilizando una técnica de biotinilación de proteínas e inmunotransferencia.

3. Determinar la Influencia de la Exposición a Estrés Agudo por Inmovilización en la Homeostasis Glutamatérgica de NAc Core y Shell, Basal y en Respuesta a Cocaína.

Se sabe que la administración repetida de droga induce cambios duraderos en la liberación de Glu en NAc (Mc Farland y col., 2003) así como en la señalización postsináptica en MSN (Conrad y col., 2008) y en la densidad de receptores mGluR2/3 dentro de NAc (Xi y col., 2002). Modelos computacionales evidenciaron que el Glu extracelular tiene diferentes concentraciones con diferentes regulaciones en los compartimentos: sináptico, perisináptico y

extrasináptico (Pendyam y col., 2009). Además, el Glu no vesicular es liberado por el intercambiador Cis-Glu (independiente de Na^+), y constituye la fuente primaria del Glu extracelular que modula la transmisión de Glu sináptico, por actuar en los receptores mGluR2/3 (Baker y col., 2002). El GLT-1 es el mayor transportador glutamatérgico que remueve por recaptación el 90% del total de Glu extracelular proveniente de fuente sináptica y extra-sináptica (Tanaka y col., 1997; Danbolt y col., 2001). Se ha demostrado en modelos animales con historia previa de autoadministración de cocaína, nicotina y heroína, una disminuida expresión del transportador GLT-1 en NAc Core (Knackstedt y col., 2010, 2012; Gipson y col., 2013; Shen y col., 2012) y como consecuencia una alteración en la homeostasis glutamatérgica (Knackstedt y col., 2010, 2012; Gipson y col., 2013). En otro estudio donde los animales tenían acceso corto o extendido a la autoadministración de cocaína, se observó una disminución dosis dependiente de GLT-1 en Core y Shell, siendo en la subestructura de Core el cambio más evidente (Smith-Fisher y col., 2009).

Considerando estos antecedentes, nos proponemos evaluar el efecto de una sola sesión de estrés a las propiedades estimulantes de cocaína sobre la liberación de Glu, como así también la liberación basal de Glu extracelular, en estructuras como NAc Core y Shell por la técnica de microdiálisis en animales despiertos. En relación con estos resultados se propuso también, evaluar la expresión del transportador GLT-1 en la fracción enriquecida de gliosoma en la estructura de NAc en animales que recibieron una sola sesión de estrés por inmovilización.

4. Determinar la Influencia del Tratamiento Previo de Ceftriaxona sobre la Expresión de la Sensibilización Inducida por Estrés Agudo por Inmovilización, a las Propiedades Estimulantes Motoras de Cocaína y los Cambios en la Homeostasis Glutamatérgica Asociados: Medidos por Determinación Neuroquímica (Captación de Glu en NAc Core) y Registros Electrofisiológicos de Funcionalidad de la Pre y Post-sinapsis [Desborde (*Spillover*) de Glu y Relación de las Corrientes AMPA/NMDA].

Diferentes estudios han demostrado utilizando un tratamiento de cinco días de Ceftriaxona (200 mg/kg) el bloqueo de la sensibilización conductual a anfetamina en un modelo de sensibilización a anfetamina aguda y crónica (Rasmussen y col., 2011 a) así como, una marcada disminución en los niveles extracelulares de Glu en NAc de manera dependiente de la dosis de Ceftriaxona utilizada (Rasmussen y col., 2011b). En estos modelos, animales expuestos simultáneamente a Ceftriaxona y anfetamina demostraron una reducción en la

actividad locomotora. Como fue mencionado previamente, Knackstedt y col. (2009, 2010) y Gipson y col. (2013) demostraron que el pretratamiento de 5-7 días con una dosis de 200 mg/kg de Ceftriaxona restaura los niveles de GLT-1 y previene la recaída a la conducta de búsqueda de cocaína (Knackstedt y col., 2010; Sari y col., 2009) en forma concomitante al restablecimiento de la homeostasis glutamatérgica y la funcionalidad del transportador GLT-1 (Trantham-Davidson y col., 2012). Resultados similares sobre la expresión y funcionalidad del GLT-1 también se obtuvieron luego de un tratamiento de AA de heroína. Al respecto, estudios de electrofisiología revelaron que el decaimiento de las corrientes NMDA fueron más lentos en estos animales, producto del desborde (*spillover*) de Glu en la zona peri-sináptica (donde se encuentran principalmente los R NMDA con la subunidad GluNR2B) debido al aumento de Glu extracelular por la disminución de GLT-1, lo cual fue revertido por el pre-tratamiento con Ceftriaxona (Shen y col., 2014). Este mismo laboratorio utilizando técnicas de electrofisiología, en animales previamente sensibilizados al tratamiento repetido de cocaína encontró un aumento en la relación AMPA/NMDA en el NAc Shell y Core, 14-21 días después de la última inyección de cocaína (Kourrich y col., 2007, Mousawwi y col., 2011), que fue revertido con un tratamiento crónico de 12 días de N-Acetil-Cisteína, lo cual llevó a una normalización de la fuerza sináptica en la neurona postsináptica (Mousawwi y col., 2011).

Utilizando como herramienta farmacológica el tratamiento de Ceftriaxona para restablecer los cambios en la homeostasis Glu, se evaluará la influencia del tratamiento con Ceftriaxona sobre la sensibilización conductual a las propiedades estimulantes de cocaína (15 mg/kg) en animales previamente estresados. Por otro lado, evaluaremos la expresión y actividad del transportador GLT-1 en animales estresados dos semanas antes y que recibieron tratamiento de Ceftriaxona por 5 días; y por último registraremos parámetros electrofisiológicos como caída de corrientes NMDA (índice de desborde de Glu en el espacio peri-sináptico) y relación AMPA/NMDA (provee una idea de la fuerza sináptica) en animales estresados dos semanas antes.

MATERIALES Y MÉTODOS

GENERALIDADES METODOLÓGICAS

Animales

Los experimentos fueron realizados utilizando ratas macho adultas de la cepa Wistar del bioterio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Se usaron animales de entre 250 y 350 g (que corresponde a dos meses de edad aproximadamente), fueron agrupados de a cuatro por caja (12 x 30 x 50 cm) y asignados al azar a los distintos grupos experimentales. Una semana después del período de habituación, se iniciaron los tratamientos. En todos los casos los animales se mantuvieron a una temperatura de 21-23 °C con libre acceso de agua y comida. Ciclo de luz-oscuridad de 12 h, comenzando el horario de luz a las 7.00 hasta las 19.00 hs. Todos los experimentos citados en la tesis fueron realizados dentro de este horario.

Los experimentos fueron llevados a cabo bajo la reglamentación de la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales del Instituto Nacional de Salud, USA, aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

Estrés Agudo por Inmovilización

Los animales fueron sometidos a una sola sesión de estrés por inmovilización durante 2 hs, entre las 10.00 y las 14.00 hs, en cilindros de plexiglas que fueron diseñados para que la cola del animal salga por una ranura y la cabeza quede expuesta para permitir la respiración. Los animales mostraron aspecto saludable, lo cual fue evidenciado por la textura del pelo y cambios leves de peso corporal (Cancela y col., 1996). El grupo control fue dejado en sus cajas sin ninguna manipulación. Veintiún días más tarde de este episodio de estrés, los animales fueron asignados a los diferentes experimentos.

Tratamiento con Ceftriaxona

Para realizar los experimentos que corresponden al objetivo 4, un grupo de animales (estrés y no estrés) recibió tratamiento con el antibiótico β -lactámico, Ceftriaxona. Ambos grupos de animales, estrés y control, a partir del día dieciséis fueron asignados aleatoriamente a una de las dos condiciones: inyección de vehículo (0.3 ml i.p.) o Ceftriaxona (200 mg/kg i.p.) durante cinco días, y luego fueron destinados a distintos experimentos.

Modelo Experimental

Los animales fueron expuestos a una sola sesión de estrés por inmovilización durante 2 hs y permanecieron en sus cajas hasta tres semanas, momento en el que recibieron una inyección aguda de cocaína (15 mg/kg i.p.) o salina, y fueron designados a los diferentes experimentos conductuales, bioquímicos y electrofisiológicos.



Figura 1. Modelo Experimental.

Análisis Estadístico

Los valores experimentales de cada grupo en los diferentes experimentos fueron promediados obteniendo la media \pm error estándar (SEM). Para la comparación estadística de los datos se utilizó el programa GRAPH PAD PRISM versión 6. El tipo de análisis estadístico realizado será detallado en cada experimento.

CIRUGÍAS

Los animales (250-350 g) fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina, 55 mg/kg y 11 mg/kg i.p., respectivamente, y colocados en un aparato estereotáxico Stoelting. La barra dental incisiva se ubicó a -3.3 mm por debajo de la línea interaural. El cráneo fue expuesto y se realizaron los orificios, con un torno odontológico, necesarios para implantar cánulas guías (para microinyecciones) o *probes* de microdiálisis y tornillos. Para fijarlos al cráneo se utilizó cemento de uso dental. Las cánulas o *probes* fueron implantadas de acuerdo con las coordenadas del Atlas Paxinos y Watson (2007), utilizando como referencia bregma como se detalla a continuación.

Cirugía para Microinyecciones

Cánulas guías de acero inoxidable (de 14 mm de largo y 22 G) fueron implantadas de forma bilateral 2.5 mm por arriba del sitio final de inyección (para evitar el reflujo del líquido inyectado). Las coordenadas utilizadas para NAc Core fueron (AP= +1.4, L= \pm 1.5, DV= -4.3) y para NAc Shell fueron (AP= +1.4, L= \pm 0.8, DV= -4.3). Finalizada la cirugía los animales recibieron inyecciones subcutáneas de una suspensión de antibióticos, penicilina/estreptomicina, para disminuir al mínimo el riesgo de infecciones. Se les permitió una recuperación de 5-6 días antes de comenzar con los experimentos conductuales.

Cirugía para Microdiálisis

Las *probes* de microdiálisis fabricadas por nosotros en el laboratorio (para una descripción detallada ver la sección de Microdiálisis) fueron implantadas de forma unilateral. Las coordenadas utilizadas para NAc Core fueron (AP= +1.4, L= \pm 1.5, DV= -7.8) y para NAc Shell fueron (AP= +1.4, L= \pm 0.8, DV= -7.8). Se permitió a los animales una recuperación de no menos de 18 hs antes de comenzar con los experimentos de microdiálisis.

Histología

Una vez finalizados los experimentos conductuales con microinyecciones y experimentos de microdiálisis, los animales fueron sacrificados, sus cerebros removidos y colocados en formaldehído 4% (o formalina) durante una semana. Posteriormente, fueron cortados en secciones coronales de 60 μ m en el crióstato y observados bajo lupa microscópica para la confirmación histológica de la localización de las cánulas guías y *probes* de microdiálisis.

ESTUDIOS CONDUCTUALES

Dos semanas después de la sesión de estrés los animales fueron operados e implantadas las cánulas de forma bilateral en NAc Core o Shell, se les permitió recuperarse y al día veintiuno después del estrés fueron microinyectados. Para efectuar las microinyecciones de los diferentes fármacos o vehículos, se removieron los obturadores de las cánulas guías y se los reemplazó por un inyector de acero inoxidable (30 G) que se extendió 2.5 mm por debajo de la cánula hasta alcanzar el sitio de inyección. Los inyectores se conectaron a una jeringa Hamilton de 10 μ l vía un catéter de polietileno (P10) unido a una

bomba de infusión Harvard (modelo 22). Finalizadas las infusiones, los inyectores se mantuvieron en el lugar por 1 min adicional para evitar reflujos y luego fueron removidos.

Para los estudios conductuales con agonista AMPA, se microinyectó en NAc Core o Shell el agonista AMPA en dosis de 0.03 ó 0.1 μg o salina como vehículo, en un volumen de 0.3 μl por lado durante 1 min. Cada animal fue considerado como su propio control, lo cual significa que primero se inyectó el vehículo salina y dos días después de la recuperación se inyectó una de las dos dosis de AMPA.

Para los estudios conductuales con antagonista de los R AMPA, CNQX, se microinyectó en NAc Core CNQX en dosis 0.01, 0.1 ó 1.0 nmol o el vehículo (DMSO) en dosis de 0.1, 1.0 ó 10.0%, en un volumen de 0.5 μl por lado en 1 min. Luego de cinco min los animales recibieron una inyección de salina o cocaína (15 mg/kg). Después de un mínimo de dos días de intervalo, cada animal recibe un máximo de dos combinaciones de DMSO o CNQX, salina o cocaína, dando lugar a dos combinaciones designadas aleatoriamente: microinyección de DMSO seguido de una inyección de salina sistémica, dos días después microinyección de DMSO seguido de una inyección de cocaína sistémica; o microinyección de CNQX seguido de una inyección salina sistémica, dos días después microinyección de CNQX seguido de una inyección de cocaína sistémica.

Registro de la Actividad Locomotora

El equipo para registrar la actividad locomotora consiste de ocho cajas rectangulares (30 cm x 19 cm x 46 cm) equipadas con dos fotocélulas de rayos infrarrojos localizados 3 cm por encima del piso. La interrupción de cualquier haz de luz resulta en una cuenta en la fotocelda que se traduce en la computadora. El equipo se encuentra en una habitación diferente de donde residen los animales y libre de ruido. Los animales se colocaron de forma individual en cada caja del equipo, se les permitió un período de habituación de 1 h y luego recibieron inyecciones i.p. (salina o cocaína) y/o microinyecciones de agonistas o antagonistas farmacológicos, la actividad locomotora fue registrada por 2 hs en intervalos de 10 min.

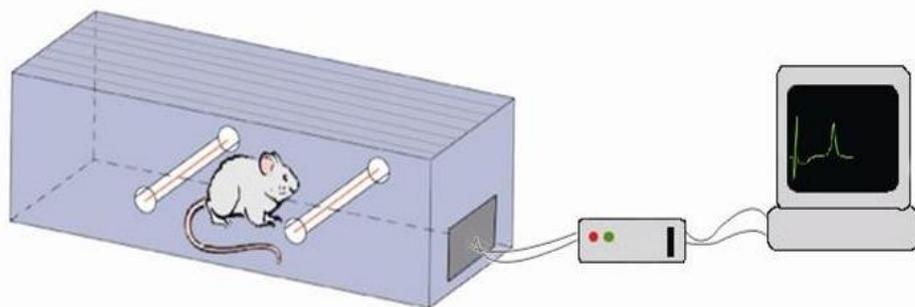


Figura 2. Representación esquemática del equipo utilizado para la medición de la actividad locomotora.

Análisis Estadístico

En los estudios conductuales donde se analizaron las cuentas totales de actividad motora, se utilizó el ANOVA de dos vías considerando los siguientes factores: estrés (estrés/no estrés) y droga (SAL/COC), o estrés (estrés/no estrés) y tratamiento (AMPA/SAL, CNQX/DMSO o CEF/VEH). Para los análisis de curso temporal, los factores bajo consideración fueron: estrés (estrés/no estrés) y tiempo, con muestras repetidas en el tiempo (lecturas cada 10 min). En ambos casos (cuentas totales y curso temporal) el test de comparaciones múltiples utilizado fue Bonferroni. Para demostrar los efectos de la inyección aguda de cocaína, se realizó un *t-test* a los tiempos 60 y 70 min desde el comienzo del registro de la actividad locomotora (se consideró 60 min como el tiempo al cual se considera que el animal se habituó al ambiente nuevo y 70 min como los primeros 10 min después de la inyección aguda de cocaína). Este análisis estadístico corresponde a los experimentos de los objetivos 1.I, 2.I y 2.II, 4.I.

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

MICRODIÁLISIS

Construcción de las *Probes*, Implantación y Colección de los Dializados.

Las *probes* de diálisis concéntricas fueron preparadas con membranas de diálisis de AN69 (Hospal, Bologna Italia) de acuerdo con el método Di Chiara y col., (1993) con modificaciones menores (Tesis de Pacchioni, 2004). El largo de la zona activa de diálisis fue 2.0 mm para el NAc Core y Shell.

Los animales fueron operados e implantadas las *probes* de diálisis en NAc Core y Shell, tres semanas después de la sesión de estrés. Luego de un período de 24 hs de recuperación se comenzó la diálisis con solución Ringer, un *buffer* de características similares a líquido cefalorraquídeo (LCR), (en nM: NaCl, 145; KCl, 4.0; CaCl₂, 2.2; de acuerdo a Pontieri y col., 1995), a un flujo constante de 1 μ l/min durante todo el experimento. Una vez estabilizados los niveles de DA o Glu en los eluatos, todos los animales recibieron una inyección de salina y luego cocaína (15 mg/kg), los dializados fueron recolectados durante 120 min y 180 min (respectivamente) en fracciones de 30 min en viales mantenidos a 4 °C por un colector de fracciones.

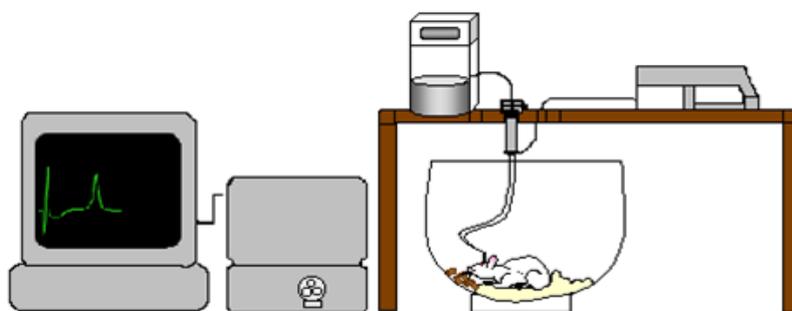


Figura 3. Representación esquemática del equipo utilizado para la microdiálisis.

Perfusión en *Buffer* de Diálisis con DMSO o CNQX.

Los animales fueron implantados con las *probes* de microdiálisis, tres semanas después de la sesión de estrés, y 24 hs después dializados con CNQX 1 nM o DMSO 10% (vehículo) disueltos en solución Ringer para que circulen de forma constante desde el comienzo de la diálisis. Una vez estabilizados los niveles basales de DA, los animales fueron inyectados con salina y las muestras recolectadas por 120 min, para luego recibir una inyección de cocaína (15 mg/kg) y las muestras ser recolectadas durante 180 min más. Los dializados fueron colectados en fracciones de 30 min a un flujo de 1 μ l/min en viales mantenidos a 4 °C por un colector de fracciones.

Niveles Basales de Glutamato Extracelular: *No Net Flux*

Tres semanas después de la exposición a estrés por inmovilización, los animales fueron implantados con las *probes* de microdiálisis y 24 hs después comenzó la diálisis con la técnica de *No Net Flux*. De acuerdo con Chefer y col. (2009), el método más aceptado para medir Glu en condiciones basales es el *No Net Flux* en la cual al aumentar las

concentraciones de Glu exógeno que circulan por la *probe*, el Glu extracelular es liberado hasta el punto donde el Glu “*in vivo*” y el Glu exógeno son equilibrados. La técnica de diálisis consiste en determinar las concentraciones basales de Glu extracelular al agregar concentraciones conocidas de Glu al *buffer* de diálisis, en concentraciones mayores y menores de las esperadas de Glu. Se obtiene así una serie de puntos o concentraciones que se utilizan para el ajuste de la regresión lineal, cuando la recta cruza al eje de las x se extrapola y se obtiene la concentración a la cual no hay cambio de flujo neto. La perfusión del *buffer* a través de la *probe* de diálisis, comienza con la concentración más baja y continúa con las siguientes de forma creciente (0.0, 2.5, 5.0, 10.0 μM). Se recolectan cuatro muestras, de 30 min de diálisis a cada concentración de Glu, siendo solo utilizadas para el análisis y estadística las tres últimas. Esto se debe a que se considera que el Glu necesita un período de tiempo para restablecer el equilibrio entre el líquido extracelular y el *buffer* de diálisis a cada una de las diferentes concentraciones de Glu utilizadas.

Este método mide alrededor de 1-30 μM de Glu extracelular en diferentes regiones del cerebro en mamíferos, mientras que en la mayoría de las estructuras se encuentra en niveles entre 1-5 μM (Lerma y col., 1986; Miele y col., 1996; Baker y col., 2003).

Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para la Cuantificación de Dopamina y Glutamato.

Los equipos ESA Coulochem II y III utilizan el método de oxidar-reducir los analitos y logran transformar el 100% de las muestras. Esto le confiere una alta sensibilidad y reproducibilidad al método, permitiendo desarrollar la microdiálisis en pequeñas áreas cerebrales como NAc Core y Shell. Las muestras fueron analizadas para determinar el contenido de DA y Glu por HPLC de fase reversa acoplado con detectores electroquímicos ESA Coulochem II y ESA Coulochem III, respectivamente. La fase móvil para cuantificar DA estuvo compuesta de (en mM): NaH_2PO_4 , 50; Na_2HPO_4 , 5; EDTA-Na, 0.1; Octilsulfonato de Sodio, 0.5; 12% de metanol y el pH ajustado a 5.5, y distribuido por una bomba (Modelo 582, solvent delivery model, ESA Chemsford, USA) a un flujo de 1 ml/min a través de una columna de RP 18 (C18, 12.5 cm x 4.0 mm, 5 μm). La fase móvil para cuantificar Glu estuvo compuesta de (en mM): Na_2HPO_4 , 100; acetonitrilo, 1.75% y 15% de metanol, el pH ajustado a 6.67 con ácido fosfórico, y distribuido por una bomba (Modelo 582, solvent delivery model, ESA Chemsford, USA) a un flujo de 0.5 ml/min a través de una columna de RP 18 (C18, 15cm x 4.6 mm, 3 μm). El Glu liberado fue medido por

derivatización con OPA/OME (oftaldehído y β mercaptoetanol disuelto en tetraborato de sodio) de acuerdo con lo descrito por Donzanti y Yamamoto (1988). Los 15 μ l del agente derivatizante OPA/OME fueron mezclados con 20 μ l del eluato de microdiálisis, el cual después de 2 min de reacción es cuantificado. Las muestras tanto para DA como para Glu fueron inyectadas en un *loop* de 20 μ l de capacidad en el equipo de HPLC. La DA fue cuantificada usando un detector coulombométrico que consiste en tres electrodos: celda de referencia (+350 mV), electrodo de oxidación (+175 mV) y detector de reducción (-175 mV) de acuerdo con el método de Pontieri (y col., 1995). Para cuantificar Glu los potenciales del detector coulombométrico en la celda de referencia (+650 mV), en el electrodo de oxidación (+150 mV) y en el detector de reducción (+550 mV) de acuerdo al método de Donzanti y Yamamoto (1988). Los picos fueron registrados y se midieron las alturas correspondientes a cada muestra con un sistema para análisis de datos cromatográficos, EZ Chrome Elite. Los valores obtenidos fueron comparados con una curva de estándares externos de DA o Glu.

Recuperación de las *Probes* de Microdiálisis

Para calcular la recuperación, se colocó la *probe* de diálisis en LCR y se conectó a la bomba. Se perfundió con el *buffer* durante 10 min a un flujo de 1 μ l/min, luego se colocó la *probe* en una solución de concentración de DA o Glu conocida y se dejó estabilizar durante 30 min. Se determinaron las concentraciones de DA o Glu en las muestras y en la solución donde se encuentra la cánula. De la comparación de ambas muestras se obtuvo el porcentaje de recuperación, siendo el porcentaje general de recuperación de 30-40%.

Análisis Estadístico

Los datos de microdiálisis de DA o Glu fueron expresados como porcentaje de la liberación basal de DA o Glu \pm SEM, excepto los valores basales que fueron expresados en fmol/20 μ l \pm SEM o pmol/muestra \pm SEM, respectivamente. Se consideró como niveles basales para cada neurotransmisor al promedio de las tres muestras tomadas antes de la administración de salina y de la droga. Los criterios utilizados para incluir los datos en el análisis estadístico fueron: que los animales presenten niveles detectables de neurotransmisores, que las muestras se estabilizaran (es decir que las muestras no difieran entre sí en más de un 15%) y que dentro del grupo su valor no excediera el valor medio \pm 2 veces la desviación estándar; por último la correcta posición de las membranas de diálisis también fue considerada.

Para el análisis estadístico de los efectos principales se realizó un ANOVA de dos vías con muestras repetidas en el tiempo. Para las comparaciones múltiples entre grupos se utilizó el test *post hoc a posteriori* de Bonferroni. Los factores bajo consideración fueron: estrés (estrés/no estrés) y tiempo, con muestras repetidas en el tiempo (en eluatos medidos cada 30 min). Para demostrar los efectos de la inyección aguda de cocaína, se realizó un *t-test* a los tiempos 210 min y 240 min o 270 min desde el comienzo de la diálisis (se consideró 210 min como el tiempo al cual se estabilizó la liberación de DA o Glu después de la inyección de salina y 240 ó 270 min como los primeros 30 min después de la inyección aguda de cocaína). Este análisis estadístico corresponde a los experimentos de los objetivos 1.II, 2.III y 3.I.

Las concentraciones basales de Glu extracelular obtenidas por *No Net Flux* fueron expresadas en μM . En la estadística se aplicó un *t-test* a los puntos donde las rectas de la regresión lineal cortan al eje de la x (equivalente a los valores basales extracelulares). Este análisis estadístico corresponde al experimento del objetivo 3.II.

WESTERN BLOT

Para los experimentos de western blot, tres semanas después de la sesión de estrés por inmovilización, los animales fueron sacrificados 45 min después de la inyección aguda de cocaína (15 mg/kg) o de salina, y los cerebros rápidamente removidos. Para la disección del tejido se realizaron cortes coronales de 2 mm de espesor de acuerdo con Heffner y col. (1980). El tejido de NAc abarcará ambas subregiones de Core y Shell, aunque conteniendo relativamente más tejido Core. Se realizó un *pool* bilateral de dos animales para obtener suficiente material para la expresión de superficie de GluR1 y del transportador de Glu, GLT-1.

Biotinilación de Proteínas de Superficie: Expresión del Receptor AMPA

Las áreas disecadas fueron transferidas a una solución fría de biotina (sulfosuccinimidil-6-[biotina-amido] hexanoato, Pierce) en *buffer* fosfato salina (PBS) (0.3 mg/ml) e incubados por 1 h a 4° C, luego fueron lavados con Tris-glicina frío, para enfriar a la biotina libre (5 min), seguido de tres lavados con tris-salina frío (TBS) (5 min x 3 veces). Las secciones de NAc fueron homogeneizadas en 300 μl de *buffer* RIPA [Tris, 50 mM; NaCl, 50 mM; Tritón-X100, 1%; deoxicolato de sodio, 0.5%; SDS 1%; inhibidores de proteasas (aprotinina, 2 $\mu\text{g/ml}$; leupeptina, 10 $\mu\text{g/ml}$; pepstatina A, 1 $\mu\text{g/ml}$; fluoruro de

fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mM y ortovanadato de sodio, 1 mM, como inhibidor de fosfatasas)]. Luego los homogenatos fueron centrifugados a 13000 g por 30 min para precipitar la fracción insoluble. Para la fracción total de GluR1 (superficie + interna), 50 μ l del sobrenadante fue mezclado y calentado con 12.5 μ l de SDS *buffer* 4x. Las proteínas de superficie biotiniladas en el resto de sobrenadante (200 μ l) fueron inmunoprecipitadas con 50 μ l de esferas de avidina-agarosa al 50% durante 2 h a 4 °C. Las esferas de agarosa fueron separadas (*pellet*) y el sobrenadante mezclado y hervido con *buffer* de siembra 4X. Las esferas fueron luego lavadas tres veces con *buffer* Tris-salina y hervidas con 50 μ l de *buffer* de siembra 2X (fracción de superficie). Alícuotas de las tres fracciones fueron utilizadas para realizar la cuantificación de proteínas utilizando la técnica de Bradford (Bio-Rad Bradford Protein Assay kit).

Las muestras de la fracción de superficie y la fracción total (superficie + interna) conteniendo 25-50 μ g de proteínas fueron detectadas por inmunotransferencia utilizando actina como control de carga de proteína. Se evaluó la inmunoreactividad utilizando anticuerpo anti- GluR1.

Control del procedimiento de la técnica de biotinilación de proteínas de superficie.

Como control de la eficiencia del procedimiento realizamos una prueba utilizando la proteína citoplasmática LIMK-1 a fin de comprobar que la misma no está presente en la fracción de superficie.

Control de la técnica con LIMK

Fracción Total Fracción Interna Fracción de Superficie



Figura 4. Control del procedimiento de la técnica de Biotinilación de proteínas de superficie. Análisis de inmunotransferencia de las proteína intracelulares no biotiniladas (Fracción Interna), proteínas biotiniladas de superficie (Fracción de Superficie) y proteínas de superficie + intracelulares (Fracción Total). La proteína citoplasmática LIMK-1 se encuentra presente solo en las fracciones total e interna.

Expresión en Gliosoma: Transportador Glutamatérgico GLT-1

Se realizó la separación de la fracción de gliosoma por gradiente de Percoll de acuerdo con Dunkley y col. (2008). El Percoll es una suspensión coloidal de partículas de sílice recubiertas con pirrolidina con un tamaño uniforme de 17 nm. El Percoll tiene dos

ventajas importantes: tiene baja viscosidad, permitiendo una rápida sedimentación y el uso de fuerzas centrífugas bajas, y además se puede utilizar para preparar soluciones isotónicas que necesiten mantener la osmolaridad. El gradiente de Percoll es ensamblado con diferentes concentraciones de Percoll al 2%, 6%, 10% y 20% en *buffer* gradiente (sucrosa, 1.28 M; EDTA, 4 mM; Tris, 20 mM; ajustado a pH de 7.4) en tubos de centrifuga con características especiales. Para cada grupo o tratamiento se utiliza un tubo diferente. El gradiente se arma de mayor a menor concentración, la fracción que corresponde al gliosoma se encuentra entre las capas de Percoll 2% y 6%. Alícuotas del sobrenadante fueron utilizadas para realizar la cuantificación de proteínas utilizando la técnica de Bradford (Bio-Rad Bradford Protein Assay kit).

Muestras conteniendo 25-50 μg de proteínas fueron detectadas por inmunotransferencia utilizando actina como control de carga de proteínas. Se evaluó la inmunoreactividad de GLT-1.

Inmunotransferencia

Luego de los procedimientos de “biotinilación de proteínas de superficie” y “separación por gradiente de Percoll” se evaluaron los niveles de las proteínas correspondientes mediante la técnica de inmunotransferencia. Con este fin las muestras correspondientes a cada grupo experimental fueron sembradas y separadas en geles de SDS-PAGE (10-12%) y posteriormente transferidas a membranas de PVDF (Fluoruro de polivinilideno, Amersham Hybond-P de GE Healthcare). Dichas membranas fueron lavadas varias veces con *buffer* TBS-Tween 0.05% o T-TBS (Tris, 20 mM; NaCl, 150 mM; Tween-20, 0.05%, pH 7.6), luego fueron incubadas con albumina sérica bovina (BSA) en T-TBS al 5% durante 1 h a 37° C, para reducir las uniones inespecíficas (bloqueo) y posteriormente incubadas durante toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario. Al día siguiente las membranas fueron lavadas con T-TBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Luego las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (según la especie del anticuerpo primario utilizado previamente) durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron lavados con T-TBS para posteriormente realizar el revelado. Para llevar a cabo el revelado de las membranas se utilizó la técnica de quimioluminiscencia con luminol, ácido cumárico como catalizador y peróxido de hidrógeno

como sustrato de reacción (ECL). El revelado se plasmó en placas de rayos X (AGFA). Finalmente el resultado obtenido en las placas de revelado fue escaneado y analizado utilizando el programa *Image J*. La cuantificación de la señal mediante el uso del *Image J*, consistió en medir la densidad óptica para cada banda estableciendo la relación entre los valores obtenidos para la proteína de interés y los valores de densidad óptica de actina utilizada como control de siembra.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con los siguientes factores: estrés (estrés/no estrés) y droga (COC/SAL) y el test de Tukey como test *a posteriori*. Este análisis estadístico corresponde a los experimentos de los objetivos 2.IV y 3.III.

CAPTACIÓN DE GLUTAMATO-H³

Dos semanas después de la sesión de estrés por inmovilización, los animales recibieron por cinco días el tratamiento con Ceftriaxona (200 mg/kg) o Vehículo. Al día veintiuno después del estrés, los animales fueron sacrificados y la captación de Glu-H³ fue medida usando una preparación “*in vitro*” como fue descrita por Knackstedt y col. (2010). Para la disección del tejido se realizaron cortes coronales de 2 mm de espesor de acuerdo con Heffner y col. (1980). El tejido de NAc contiene ambas subregiones de Core y Shell, aunque conteniendo relativamente más tejido de Core. Por cada animal se utiliza el NAc de cada hemisferio para evaluar la actividad de GLT-1 y de XC-. El tejido fue cortado en rebanadas de 250 x 250 µm de sección usando McIlwan.

Los cortes fueron oxigenados e incubados a 37 °C en una solución de Ringer fosfato (en mM: NaCl, 140; CaCl₂, 1.3; KH₂PO₄, 1.2; HEPES, 5; glucosa, 10 y 1 MgCl₂, pH 7.4) para cuantificar la captación de Glu Na⁺ dependiente, o en un *buffer* idéntico pero el NaCl fue reemplazado por 140 mM de cloruro de colina para medir la recaptación de glutamato Na⁺ independiente. La captación fue estimulada por la adición de L-Glu-H³ (40 nM, 51 Ci/mM; PerkinElmer) a los tejidos en presencia de 10 µM de L-glutamato. La reacción fue realizada a 37 °C por 15 min y finalizada al agregar *buffer* libre de Na⁺ en frío. Las rebanadas fueron solubilizadas en SDS al 1% y la radioactividad determinada usando un contador de centelleo. El contenido de proteínas fue medido y las cuentas fueron calculadas en pmol/mg de proteínas en 15 min de reacción. Como se explica anteriormente se utilizan dos *buffers* de

características diferentes para esta técnica, cada uno proporciona un resultado diferente. Si el *buffer* es libre de Na^+ , el ensayo de *uptake* de Glu-H^3 evalúa la actividad del sistema intercambiador XC- (Mendelez y col., 2005), y si el *buffer* contiene Na^+ , el ensayo de *uptake* de Glu-H^3 evalúa la actividad del transportador GLT-1.

Los estudios de captación de Glu-H^3 se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr Peter Kalivas, MUSC, Medical University of South Caroline, Carolina del Sur, EEUU.

Análisis Estadístico

Los resultados bioquímicos fueron analizados utilizando análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con los siguientes factores: estrés (estrés/no estrés) y tratamiento (CEF/VEH), el test de Bonferroni fue utilizado como el test a *posteriori*. El análisis se independizó del glutamato independiente de Na^+ , debido a que no había cambio por estrés, ni por el tratamiento con Ceftriaxona. Este análisis estadístico corresponde al experimento del objetivo 4.III.

ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Análisis de Células Completas en Cortes de Cerebro Agudo.

Dos semanas después de la sesión de estrés por inmovilización, los animales recibieron por cinco días el tratamiento con Ceftriaxona (200 mg/kg) o Vehículo. Al día veintiuno después del estrés, los animales fueron anestesiados con Ketamina (87.5 mg/kg i.p.) y los cerebros rápidamente removidos en aCSF frío (*buffer* de características de LCR).

Se realizaron cortes coronales (230 μm de ancho) conteniendo el NAc en aCSF frío en vibrátomo e incubado a 32 °C (en mM; NaCl, 126; KCl, 2.5; NaH_2PO_4 , 1.4; MgCl_2 , 1.2; CaCl_2 , 2.4; NaHCO_3 , 25; glucosa, 11) al menos durante 45 min a temperatura ambiente antes de comenzar los registros. Se agregó picrotoxina (50 μM) al *buffer* para bloquear los receptores de ácido- γ -aminobutirico (GABA A) que median las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs) durante los registros. Las células fueron visualizadas usando una óptica de contraste de interferencia. Para evaluar la transmisión sináptica excitatoria, las neuronas fueron fijadas a un voltaje constante de -80 mV usando Multiclamp 700 A amplificador (Molecular Devices, Foster City, CA). Los electrodos tipo *patches* (1.5-2 $\text{M}\Omega$) fueron llenados con solución interna conteniendo (en mM; Cesio Metansulfonato, 124; NaCl, 10; MgCl_2 , 1;

HEPES, 10; EGTA, 1; QX-314, 1; MgATP, 2 y 0.3 MgGTP (275–285 mOsm, pH 7.2–7.4). La resistencia en serie (<20 M Ω) y la resistencia de entrada fue monitoreada en línea con un paso despolarizante en 5 mV (100 ms) dado para cada estímulo. Las aferencias fueron estimuladas a 0.05 Hz por un electrodo bipolar concéntrico ubicado a 150 μ m dorsomedial al NAc Core. Los registros “*in vivo*” fueron hechos en la entrada de la vía Prefrontal que son los más densos (Voorn y col., 2004; Gorelova y Yang 1997). Las MSN fueron visualizadas usando video microscopia.

Decaimiento de las Corrientes NMDA

La intensidad de la estimulación fue elegida para evocar 500-600 pA en corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) que se encuentran a -80 mV de voltaje constante. Las aferentes glutamatérgicas fueron estimuladas eléctricamente y las corrientes NMDA fueron aisladas farmacológicamente por el agregado de CNQX, antagonista de los R AMPA (10 μ M) a +40 mV de voltaje constante. Los datos fueron filtrados a 2 kHz y digitalizados a 5 kHz. El decaimiento de las corrientes NMDA fueron cuantificadas por el tiempo transcurrido desde el pico de las EPSC al 50% de amplitud usando AxoGraphX.

Relación de AMPA/NMDA

Las EPSC fueron evocados usando estimulación bipolar a ~ 100-200 μ m. Las corrientes AMPA fueron aisladas por agregar un antagonista del receptor NMDA, D-AP5 a +40 mV y las corrientes NMDA fueron obtenidas de sustraer las corrientes AMPA del total de las corrientes (Kourrich y col., 2007). Los datos fueron analizados usando AxoGraph X software (AxoGraph Scientific, Sydney, Australia).

Los estudios de electrofisiología se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr Peter Kalivas, MUSC, Medical University of South Caroline, Carolina del Sur, EEUU.

Análisis Estadístico

Los resultados de decaimiento de las corrientes NMDA fueron evaluados utilizando análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con los siguientes factores: estrés (estrés/no estrés) y número de pulsos (1, 2, 4, 8). Los datos del experimento que evalúa la relación AMPA/NMDA fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con los grupos No Estrés/VEH, Estrés/VEH y Estrés/CEF. El test de Bonferroni fue utilizado

como el test a *posteriori*. Este análisis estadístico corresponde a los experimentos de los objetivos 4.IV y 4.V.

DROGAS

- **Clorhidrato de cocaína (Laboratorios Verardo. Buenos Aires, Argentina).**

Las dosis utilizadas de cocaína fueron de 5.0, 10, o 15 mg/kg i.p. preparado en solución salina 0.9% o solución fisiológica.

- **Agonista competitivo de los receptores AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropiónico (AMPA, Sigma-Aldrich)**

Las dosis de AMPA fueron elegidas a partir del trabajo de Pierce y col., (1996), donde se demostró que la microinyección de la dosis de 0.1 pero no 0.03 μ g administrada en NAc Core, tres semanas después del tratamiento crónico con cocaína indujo un aumento de la actividad motora significativamente mayor al observado en el grupo control previamente tratado con vehículo.

- **Antagonista competitivo de los receptores AMPA: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, Sigma-Aldrich)**

Las dosis de CNQX (0.01, 0.1 y 1.0 nmol) fueron elegidas a partir del trabajo de Pierce y col., (1996), donde se demostró que tanto la dosis intermedia de 0.1 nmol como la más alta de 1.0 nmol fueron capaces de atenuar y/o revertir la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por el tratamiento crónico previo con la droga. Además, estudios de nuestro laboratorio han demostrado que tres semanas después de la exposición crónica a estrés, la microinyección de 0.1 y 1 nmol de CNQX intra-NAc core, bloqueó la respuesta motora sensibilizada a cocaína sin interferir la respuesta aguda de la droga en animales control.

- **Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich)**

Los porcentajes utilizados de DMSO de 0.1, 1.0, 10% corresponden con las diluciones que son necesarias para las diferentes dosis de CNQX utilizadas (0.01, 0.1, 1.0 nmol), respectivamente.

- **Antibiótico β -lactámico: Ceftriaxona**

La dosis de Ceftriaxona fue elegida de acuerdo con el trabajo de Rothstein y col. (2005), en el cual se demostró que la administración de 200 mg/kg de Ceftriaxona en animales controles diariamente durante 5 días, induce un aumento de la expresión de GLT-1. Además, demostraron que un tratamiento similar con Ceftriaxona revirtió la disminución en los niveles de GLT-1 así como la sensibilización conductual a anfetamina inducida por la pre-exposición aguda o crónica a esta droga (Rasmussen y col., 2011a, b).

ANTICUERPOS

Los siguientes anticuerpos primarios fueron utilizados: anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra actina (1: 500; Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra α -tubulina (1: 2000; Sigma-Aldrich), anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra LIMK-1 (1: 100; Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra GluR1 (1: 400; Millipore), anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra GLT-1 (1: 1000; Cell Signaling).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-IgG de cabra conjugado a peroxidasa (1: 2000; Jackson Laboratories), anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (1: 2000; Jackson Laboratories), anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1: 2000; Jackson Laboratories)

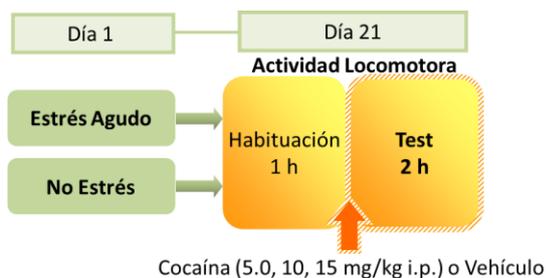
RESULTADOS

1. Influencia de la Exposición a Estrés Agudo por Inmovilización Sobre los Efectos Estimulantes Motores de Cocaína y Liberación de DA en NAc Core y Shell.

1.1. La Previa Exposición a Estrés Agudo Indujo Sensibilización a los Efectos Estimulantes Motores de Cocaína.

Diseño Experimental

Tres semanas después del estrés agudo, los animales fueron habituados durante 1 h a las cajas de registro de actividad locomotora. Luego recibieron una de las dosis de cocaína (5.0, 10.0, 15.0 mg/kg) o salina y la respuesta conductual fue monitoreada durante 2 hs en intervalos de 10 min.



Resultados

Se realizó una curva dosis-respuesta de la expresión de la actividad locomotora a las propiedades estimulantes de cocaína. Como se observa en la figura 1.I A se obtuvo un aumento en la respuesta conductual dependiente de la dosis de cocaína utilizada en ambos grupos de animales, estrés y no estrés. Se observó que la dosis de 15 mg/kg indujo una marcada diferencia significativa entre los grupos control y estrés, denotándose en este último grupo la expresión del fenómeno de sensibilización cruzada a cocaína. Los datos en la figura 1.I A fueron analizados por un ANOVA de dos vías (estrés x droga) y la estadística reveló efecto de estrés, $F_{(1,55)}=23.31$, $p<0.001$; de droga, $F_{(3,55)}=36.87$, $p<0.001$ y de interacción entre ambos, $F_{(3,55)}=3.83$, $p<0.05$. Comparaciones *post-hoc* de Bonferroni indicaron que las cuentas totales observadas en el grupo estrés/COC (15 mg/kg) fueron diferentes de no estrés/COC (15 mg/kg), $***p<0.001$; diferente de estrés/COC (10 mg/kg), $^{++}p<0.01$; y también diferente de no estrés/COC (10 mg/kg), $^{####}p<0.0001$. El efecto de la inyección aguda de cocaína de 15 mg/kg también fue evidente cuando se analizó el curso temporal

(figura I.1 E). Los datos de la actividad locomotora fueron analizados por ANOVA de dos vías (estrés x tiempo) con muestras repetidas en el tiempo.

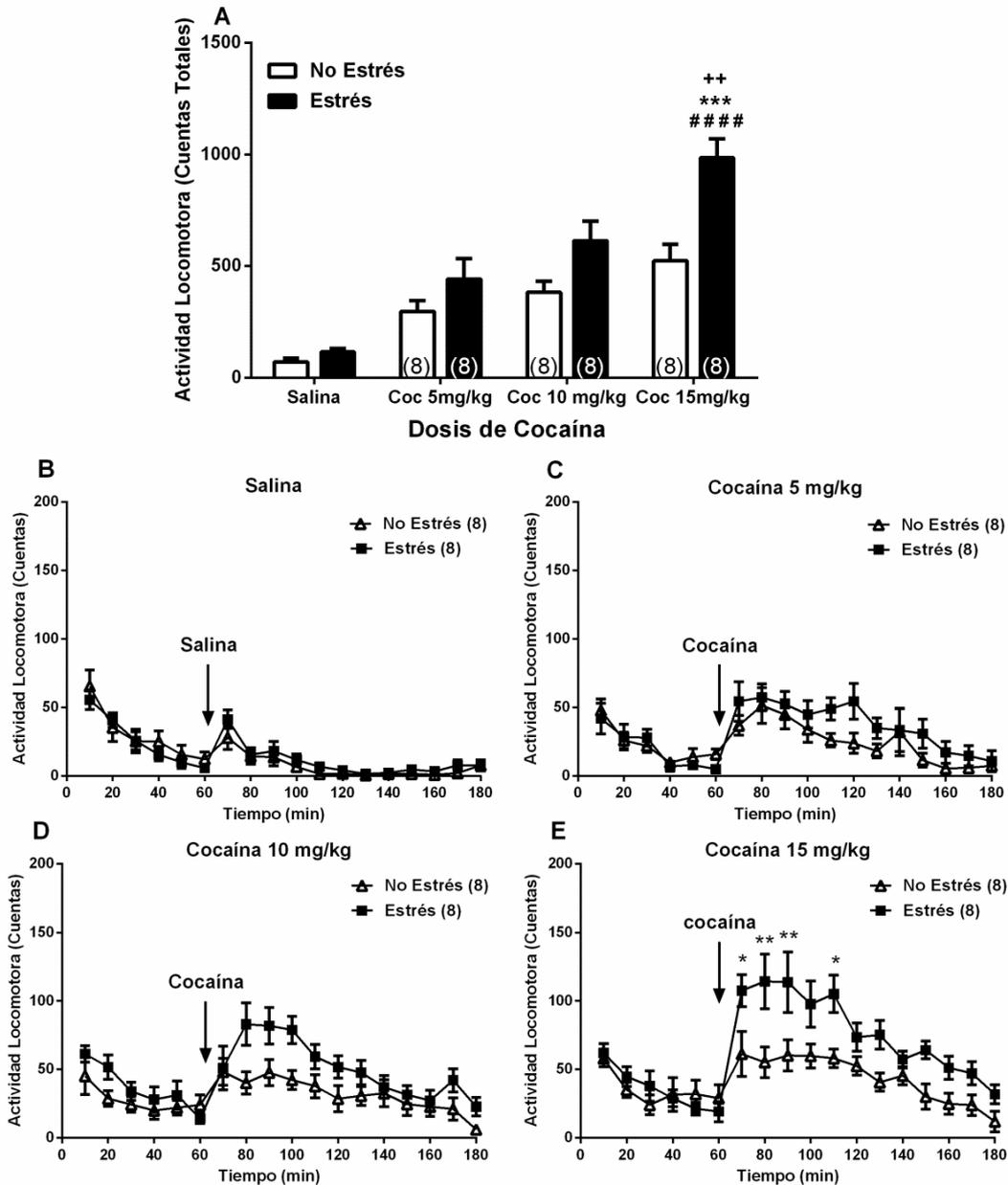


Figura 1.I. Efecto de la administración de cocaína sobre la actividad locomotora, tres semanas después del estrés agudo. (A) Los valores representan las medias de las cuentas horizontales totales (\pm SEM) durante 120 min luego de la inyección de salina o las diferentes dosis de cocaína (5, 10 ó 15 mg/kg). $***p < 0.001$ comparado con el grupo no estrés/COC (15 mg/kg), $^{++}p < 0.01$ comparado con el grupo estrés/COC (10 mg/kg), y $^{####}p < 0.0001$ comparado con el grupo no estrés/COC (10 mg/kg). (B, C, D) Los valores representan el promedio de cuentas \pm SEM en intervalos de 10 min, y corresponde a los mismos animales de la figura 1.I A. El período entre 10 y 60 min corresponde al tiempo de habituación de los animales previo a inyección de salina o cocaína. (B) Curso temporal de la actividad locomotora de animales inyectados con salina; (C) con cocaína 5 mg/kg; (D) cocaína 10 mg/kg y (E) cocaína 15 mg/kg. $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$ comparado con el grupo no estrés. En los gráficos se indica el número de animales por grupo.

La estadística reveló efecto de estrés, $F_{(1,23)}=11.88$, $p<0.01$; de tiempo, $F_{(17,23)}=12.00$, $p<0.001$ y de interacción entre ambos, $F_{(3,55)}=3.83$, $p<0.05$. El test a posteriori de Bonferroni indicó que el número de cuentas era significativamente mayor en el grupo estrés a los 70 y 110 min, $*p<0.05$, y a los 80 y 90 min, $**p<0.01$, después la inyección aguda de cocaína de 15 mg/kg, respecto de los controles. En concordancia con los resultados obtenidos, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron expresión de sensibilización conductual a las propiedades estimulantes motoras de cocaína 15 mg/kg (Esparza y col., 2012) o anfetamina (Díaz-Otañez y col., 1997; Pachioni, y col., 2007) luego de estrés crónico o agudo por inmovilización, respectivamente.

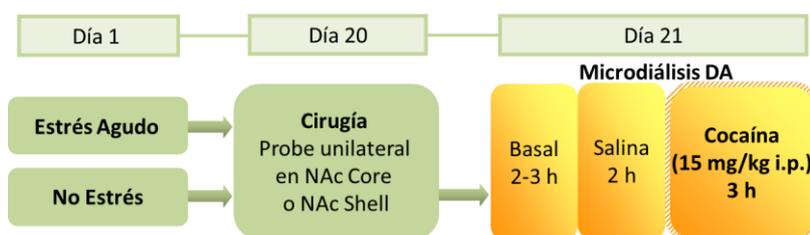
Conclusión Parcial

Estos resultados indican que la exposición a una sola sesión de estrés por inmovilización indujo el fenómeno de sensibilización cruzada de largo término a los efectos estimulantes de cocaína (15 mg/kg) sobre la actividad motora, dependiente de la dosis de la droga, tres semanas después de la aplicación del estresor.

1.II. La Previa Exposición a Estrés Agudo Indujo Sensibilización al Aumento en la Liberación de DA en NAc Core no así en Shell, Luego de la Inyección Aguda de Cocaína.

Diseño Experimental

Tres semanas después del estrés agudo, los animales fueron operados e implantadas las *probes* de diálisis en NAc Core y Shell. Se dejó no menos de 24 hs a que los animales se recuperen y se comenzó la diálisis. Luego de establecer los niveles basales de DA, los animales recibieron una inyección de salina, se recolectaron muestras por 120 min y seguido de una inyección de cocaína (15 mg/kg) con muestras que se recolectaron por 180 min más.



Resultados

Se evidenció expresión de la sensibilización cruzada a los efectos estimulantes de cocaína sobre la liberación de DA en NAc Core, pero no NAc Shell, en animales que fueron previamente expuestos a estrés. Específicamente, animales pertenecientes al grupo estrés mostraron un aumento de la liberación de DA inducido por cocaína en NAc Core significativamente mayor al inducido por la misma dosis de cocaína en animales del grupo no estrés (figura **1.II A**). El análisis por ANOVA de dos vías (estrés x tiempo) con muestras repetidas en el tiempo, arrojó un efecto significativo de estrés, $F_{(1,208)}=5.36$, $p<0.05$; tiempo, $F_{(13,208)}=9.92$, $p<0.001$ y de la interacción entre ambos, $F_{(3,55)}=2.50$, $p<0.05$. El test de comparaciones múltiples *post hoc* de Bonferroni reveló diferencia significativa entre el grupo estrés y control en NAc Core a los 30 min posteriores a la inyección aguda de cocaína, $**p<0.01$. El *t-test* realizado a los 240 min respecto de los 210 min desde el comienzo de la diálisis, demostró que existe un efecto en la liberación de DA luego de la inyección aguda de la droga en el grupo estrés, $t\text{-test}_{16}=6.61$, $+++p<0.001$. Efecto que también fue observado en el grupo no estrés $t\text{-test}_{16}=2.86$, $\#p<0.05$ a los tiempos 240 min respecto de 210 min desde el comienzo de la diálisis. Es interesante remarcar que el pico máximo de efecto de cocaína (15 mg/kg) sobre la liberación de DA en NAc Core se correlaciona temporalmente con los efectos estimulantes motores de cocaína observados en los grupos controles y experimentales observados en la figura **1.I E**. Por el contrario, cuando se evaluó en NAc Shell el porcentaje de liberación de DA frente a una dosis desafío de cocaína de 15 mg/kg, como se observa en la figura **1.II B**, no se observaron diferencias significativas entre los grupos estrés y no estrés. La estadística arrojó solo efecto de tiempo, $F_{(13,156)}=5.82$, $p<0.001$, sin observarse diferencia por el tratamiento previo. El *t-test* realizado a los tiempos 240 min respecto de los 210 min del comienzo de la diálisis, demostró que hay efecto en la liberación de DA luego de la inyección aguda de la droga tanto en el grupo estrés $t\text{-test}_{12}=2.47$, $+p<0.05$, como en el grupo no estrés, $t\text{-test}_{12}=2.99$, $\#p<0.05$ (**B**). La diferencia en la funcionalidad dopaminérgica observada entre las estructuras Core y Shell luego de la inyección de cocaína en los animales previamente estresados, concuerda con los resultados a largo plazo observados por Pachioni y col. (2007) en un modelo de sensibilización cruzada inducida por estrés en respuesta a una dosis subsecuente de anfetamina.

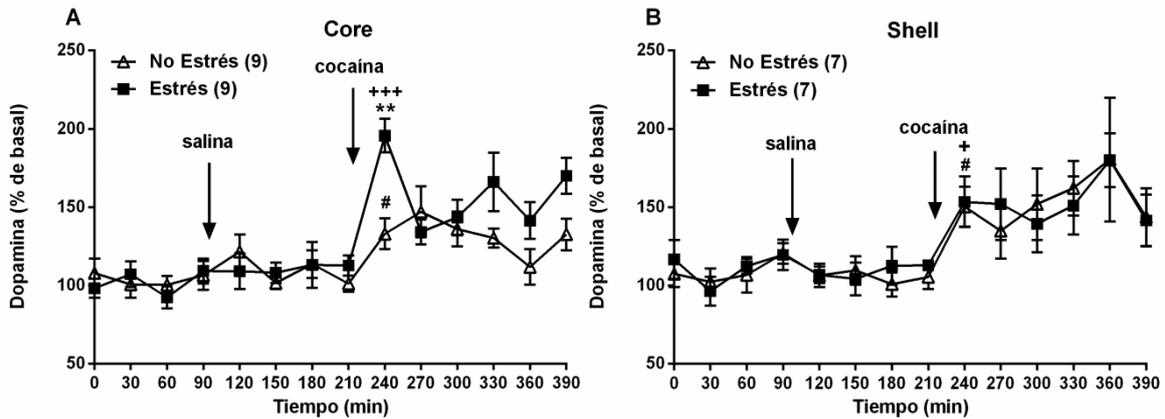


Figura 1.II. Efecto estimulante de cocaína (15 mg/kg) sobre la liberación de DA en NAc Core y Shell, tres semanas después del estrés agudo. Los valores representan el promedio (\pm SEM) del porcentaje de aumento de liberación de DA respecto de los niveles basales. El período de 0 a 90 min corresponde a las determinaciones basales de los niveles de DA. La inyección de salina fue administrada a los 90 min, y la inyección de cocaína (15 mg/kg) a los 210 min respecto del comienzo de la diálisis. Las muestras se colectaron cada 30 min a un flujo de 1 μ l/min. **(A)** NAc Core, ** $p < 0.01$ comparado con el grupo no estrés y *** $p < 0.001$ comparado con los niveles basales del grupo estrés. # $p < 0.05$ comparado con los niveles basales del grupo no estrés. **(B)** NAc Shell, + $p < 0.05$ comparado con los niveles basales del grupo estrés. # $p < 0.05$ comparado con los niveles basales del grupo no estrés. En los gráficos se indica el número de animales de cada grupo.

Niveles Basales de DA

Los niveles basales de DA fueron expresados en fmoles/20 μ l. No se observaron diferencias significativas entre los grupos control y experimental. Descripción tabla 1.I.

Estructura	No Estrés (fmol/muestra)	Estrés (fmol/muestra)
NAc Core	26.44 \pm 2.23	29.43 \pm 1.73
NAc Shell	25.70 \pm 1.00	30.72 \pm 1.92

Tabla 1.I. Niveles basales de DA expresados en fmoles/20 μ l, descritos como las medias \pm SEM. Los valores corresponden a los valores basales de DA obtenidos en los grupos no estrés y estrés del experimento anterior.

Histología

En la figura 1.II C se representa la ubicación de las membranas activas de las *probes* de diálisis en NAc Core y Shell de los animales que fueron incluidos en los análisis estadísticos luego de los experimentos de microdiálisis de DA.

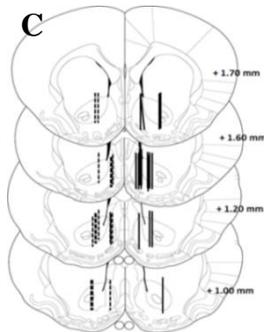


Figura 1.II C. Secciones esquemáticas del cerebro de rata, adaptadas del atlas de Paxinos y Watson, 2007. La línea punteada corresponde al tracto de las *probes* de animales controles, las líneas completas corresponde a los animales estrés.

Conclusión Parcial

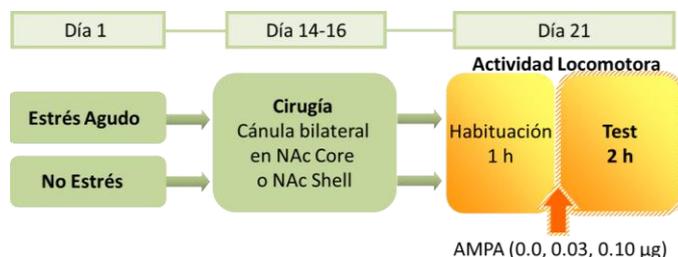
Estos resultados indican que una sola sesión de estrés por inmovilización indujo el fenómeno de sensibilización cruzada a las propiedades estimulantes de cocaína (15 mg/kg) sobre la liberación de DA en NAc Core, pero no en Shell, tres semanas después de la aplicación del estresor.

2. Influencia de la Exposición a Estrés Agudo por Inmovilización Sobre la Expresión de Superficie de Receptores AMPA en Membranas de NAc, así como el Rol Funcional de los receptores AMPA, en la Expresión de la Sensibilización Cruzada, sobre las Propiedades Estimulantes de Cocaína (15 mg/ kg) en la Actividad Motora y la Liberación de DA en NAc Core y Shell.

2.I. La Microinyección del Agonista AMPA en NAc Core, pero no en Shell, Indujo la Expresión de la Sensibilización Motora en Animales Expuestos a Estrés.

Diseño Experimental

Dos semanas después del estrés los animales fueron operados e implantadas las cánulas guías en NAc Core y Shell. Una semana después de la cirugía, fueron habituados durante 1 h a las cajas de registro de actividad locomotora y luego microinyectados en Core o Shell con una de las dosis de agonista de los receptores AMPA (0.03, 0.1 μ g) o salina, y la respuesta conductual fue monitoreada durante 2 hs en intervalos de 10 min.



Resultados

La administración intra-Core de AMPA indujo un incremento dosis-dependiente en las cuentas horizontales totales en ambos grupos, estrés y no estrés. No obstante, este aumento después de la dosis mas alta de AMPA (0.10 μ g), fue significativamente mayor en los animales previamente estresados que en los controles. En la figura **2.I A** se muestra la respuesta conductual a las microinyecciones de AMPA en NAc Core, datos analizados por ANOVA de dos vías (estrés x tratamiento). La estadística reveló efecto de estrés, $F_{(1,39)}=18.12$, $p<0.001$; de tratamiento, $F_{(2,39)}=68.29$, $p<0.001$ y de interacción entre ambos factores, $F_{(2,39)}=12.47$, $p<0.001$. El test de comparaciones múltiples (Bonferroni) determinó una diferencia significativa de $***p<0.001$ entre animales pre-estresados y controles con la

dosis de 0.10 μg de AMPA. En la figura 2.I B-C se observa el curso en el tiempo de la actividad locomotora que corresponde a las dosis de 0.03 μg y 0.10 μg de AMPA en NAc Core. La estadística demostró diferencia significativa entre los grupos con la dosis de 0.10 μg de AMPA, analizado por ANOVA de dos vías (estrés x tiempo) con muestras repetidas en el tiempo (2.I C). Se evidenció efecto de estrés, $F_{(1,13)}=14.20$, $p<0.01$ y de tiempo, $F_{(17,13)}=12.42$, $p<0.001$ así como una interacción entre ambos factores, $F_{(17,13)}=2.74$, $p<0.001$. El test de comparaciones múltiples (Bonferroni) determinó una diferencia significativa entre los grupos de animales no estrés y estrés a los tiempos de 80, 90 y 100 (** $p<0.01$) y a los 110 min (* $p<0.05$) después de la microinyección de AMPA.

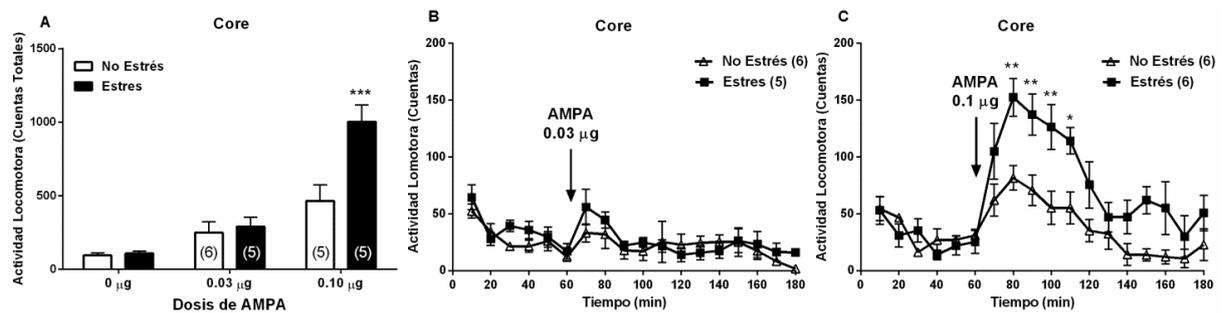


Figura 2.I. Efecto de la microinyección del agonista AMPA en NAc Core sobre la actividad motora, tres semanas después del estrés agudo. (A) Los valores representan las medias de las cuentas horizontales totales (\pm SEM) durante 120 min luego de la microinyección de AMPA (0.0, 0.03, 0.10 μg). *** $p<0.001$ comparado con el grupo no estrés/AMPA 0.10 μg . (B, C) Los valores representan el promedio de cuentas \pm SEM en intervalos de 10 min, y corresponde a los mismos animales de la figura 2.1 A. El período entre 10 y 60 min corresponde al tiempo de habituación de los animales previo a la microinyección de salina o agonista. (B) Curso temporal de la actividad locomotora de animales microinyectados con agonista AMPA 0.03 μg y (C) agonista AMPA 0.10 μg . * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ comparado con el grupo no estrés. En los gráficos se detalla el número de animales por grupo.

En otro grupo de animales, luego de la microinyección del agonista AMPA (0.0, 0.03, 0.10 μg) en NAc Shell se observó un incremento dosis-dependiente en las cuentas totales horizontales de ambos grupos, pero sin evidenciarse diferencias significativas entre los grupos estrés y no estrés (figura 2.I D). La estadística reveló efecto de tratamiento, sin diferencias significativas del factor estrés (ANOVA de dos vías (estrés x tratamiento), efecto de tratamiento, $F_{(2,32)}=12.17$, $p<0.001$). En las figuras 2.I E-F se muestra el curso en el tiempo de la actividad locomotora que corresponde a las dosis de 0.03 μg y 0.10 μg de AMPA, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los grupos estrés y no estrés en los distintos puntos de registro luego de la administración del agonista AMPA en

Shell. Nuestros resultados concuerdan con el estudio farmacológico de Pierce y col. (1996) el cual demostró que la microinyección de la dosis más alta de agonistas AMPA (0.10 μg) en NAc Core, pero no en Shell, induce la expresión de la sensibilización conductual a cocaína en animales con previa administración repetida de la droga. Además, las diferencias sobre la transmisión glutamatérgica en los subnúcleos de NAc, Core y Shell, se encuentran en correlación con estudios de diferencias anatómicas y funcionales observadas entre estos dos subcompartimentos (Maldonado-Irizarry y Kelley, 1994; Pulvirenti y col., 1994; Pierce y col., 1996).

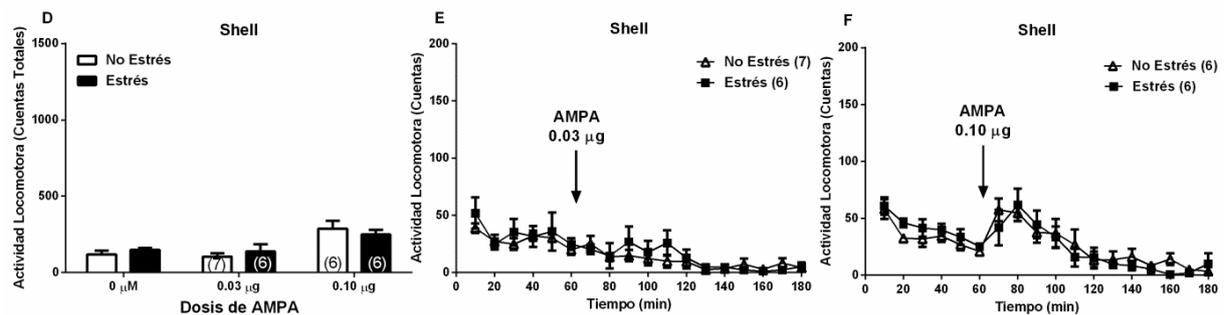


Figura 2.I. Efecto de la microinyección de agonistas AMPA en NAc Shell sobre la actividad motora, tres semanas después del estrés agudo. (D) Los valores representan las medias de las cuentas horizontales totales (\pm SEM) durante 120 min luego de la microinyección de AMPA (0.0, 0.03, 0.10 μg). **(E, F)** Los valores representan el promedio de cuentas \pm SEM en intervalos de 10 min, y corresponde a los mismos animales de la figura 2.1 D. El período entre 10 y 60 min corresponde al tiempo de habituación de los animales previo a la microinyección de salina o agonista. **(E)** Curso temporal de la actividad locomotora de animales microinyectados con agonista AMPA 0.03 μg y **(F)** agonista AMPA 0.10 μg . En los gráficos se detalla el número de animales por grupo

Histología

En la figura 2.I G se representa la ubicación de las cánulas para la microinyección del agonista AMPA (0.0, 0.03, 0.10 μg) en NAc Core y Shell, correspondiente a los animales que fueron incluidos en los análisis estadísticos.

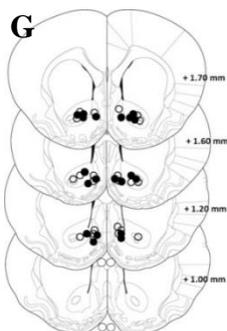


Figura 2.I G. Secciones esquemáticas del cerebro de rata, adaptadas del atlas de Paxinos y Watson, 2007. Los círculos vacíos corresponden a la ubicación de las cánulas en el grupo control y los círculos llenos denotan la ubicación de las cánulas en el grupo estrés.

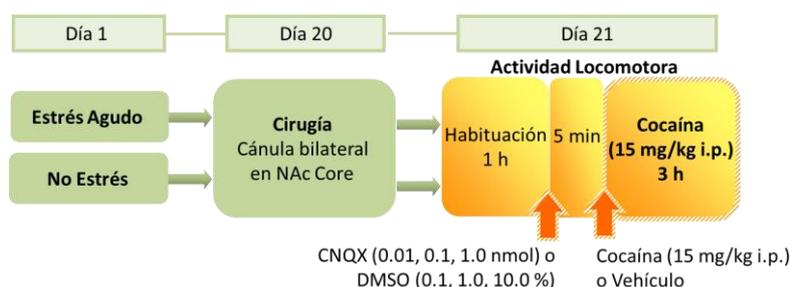
Conclusión Parcial

Estos resultados demuestran que la administración del agonista AMPA 0.1 μ g en NAc Core, pero no en NAc Shell, provocó un aumento mayor de la actividad locomotora en los animales previamente estresados que en los controles, tres semanas después de la aplicación del estresor.

2.II. El Bloqueo de los Receptores AMPA en el NAc Core Previene la Expresión de la Sensibilización Cruzada a Cocaína inducida por Estrés Agudo.

Diseño Experimental

Dos semanas después del estrés los animales fueron operados e implantadas las cánulas guías en NAc Core y Shell. Una semana después de la cirugía los animales fueron microinyectados en Core con una de las dosis del antagonista de receptor AMPA, CNQX (0.01, 0.1, 1.0 nmol) o DMSO (0.1, 1.0, 10%), las cuales fueron seguidas de una inyección de cocaína (15 mg/kg) o salina, y la respuesta conductual monitoreada durante 2 hs en intervalos de 10 min.



Resultados

En concordancia con los resultados obtenidos en la figura **1.I A**, los resultados de la figura **2.II A** confirman que el aumento de los efectos estimulantes motores de una dosis aguda de cocaína (15 mg/kg) fue mayor en animales previamente expuestos a una sola sesión de estrés por inmovilización con respecto a un grupo control que no fue expuesto a estrés. Es importante destacar de la figura **2.II A** que el pre-tratamiento con CNQX a la dosis de 1.0 nmol, la dosis más alta utilizada, en el NAc Core, bloqueó la expresión de la sensibilización a las propiedades estimulantes locomotoras de cocaína inducida por estrés por inmovilización tres semanas antes (Figura **2.II A** estrés $F_{(1,19)}=10.79$, $p<0.01$, tratamiento $F_{(1,19)}=21.60$, $p<0.001$, interacción estrés x tratamiento $F_{(1,19)}=10.21$, $p<0.01$). Comparaciones *post-hoc* de

Bonferroni indicaron que las cuentas totales observadas en el grupo estrés/DMSO (10%) fueron diferentes de no estrés/DMSO (10%), *** $p < 0.001$; diferente de estrés/CNQX (1 nmol), +++ $p < 0.001$ y también diferente de no estrés/CNQX (1 nmol), #### $p < 0.0001$. La dosis más baja e intermedia de CNQX (0.01 y 0.1 nmol) denotaron diferencias significativas solo por la condición estrés. (CNQX 0.01 nmol: estrés, $F_{(1,21)}=19.39$, $p < 0.001$ y CNQX 0.1 nmol estrés, $F_{(1,20)}=10.36$, $p < 0.001$). Los datos de la figura **2.II A** fueron analizados por separado para cada dosis de CNQX.

En las figura **2.II B-D** se observa el curso temporal de la actividad locomotora de animales pertenecientes a los grupos estrés y no estrés inducida por una inyección i.p. de cocaína (15 mg/kg), luego de haber recibido (5 min antes) una microinyección de DMSO 1% o 10% en Core. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías (estrés x tiempo) con muestras repetidas en el tiempo. En la figura **2.II B** se puede observar que la estadística reveló un efecto de estrés, $F_{(1,11)}=11.76$, $p < 0.01$; tiempo, $F_{(17,187)}=8.85$, $p < 0.001$ e interacción entre ambos factores de $F_{(17,187)}=2.70$, $p < 0.001$. El test de Bonferroni de comparaciones múltiples determinó que el grupo estrés/vehículo inyectado con cocaína muestra un número de cuentas significativamente mayor a los 80 min (* $p < 0.05$), 90 y 100 min (*** $p < 0.001$) respecto del grupo no estrés/vehículo. En la figura **2.II D** el análisis estadístico reveló efecto de estrés, $F_{(1,11)}=19.69$, $p < 0.001$; tiempo, $F_{(17,187)}=13.30$, $p < 0.001$ y de interacción entre ambos factores, $F_{(17,187)}=2.17$, $p < 0.01$. El test *a posteriori* de Bonferroni arrojó una diferencia entre los grupos estrés y control de * $p < 0.05$ a los 70 min, y de ** $p < 0.01$ a los 80, 90, 100 y 110 min después de la microinyección de DMSO 1.0% intra-Core y la dosis aguda de cocaína intraperitoneal. En otro grupo de animales se evaluó el curso temporal de la actividad locomotora en animales que recibieron una microinyección de CNQX a la dosis de 0.1 nmol o 1.0 nmol, y 5 min más tarde recibieron una inyección i.p. de cocaína 15 mg/kg (figura **2.II C-D**, respectivamente). Al analizar estos gráficos no se observó diferencias significativas entre los grupos tratados a ninguna de las dosis de CNQX administradas, indicando una atenuación o reversión de la expresión de la sensibilización a las propiedades estimulantes locomotoras de cocaína (15 mg/kg) inducida por estrés. Este resultado demuestra que los receptores AMPA se encontraban parcialmente bloqueados o bloqueados a las concentraciones de CNQX de 0.1 y 1.0 nmol. Es interesante destacar que el efecto agudo de la inyección de cocaína sí fue observado en ambos grupos, respecto de la inyección de salina.

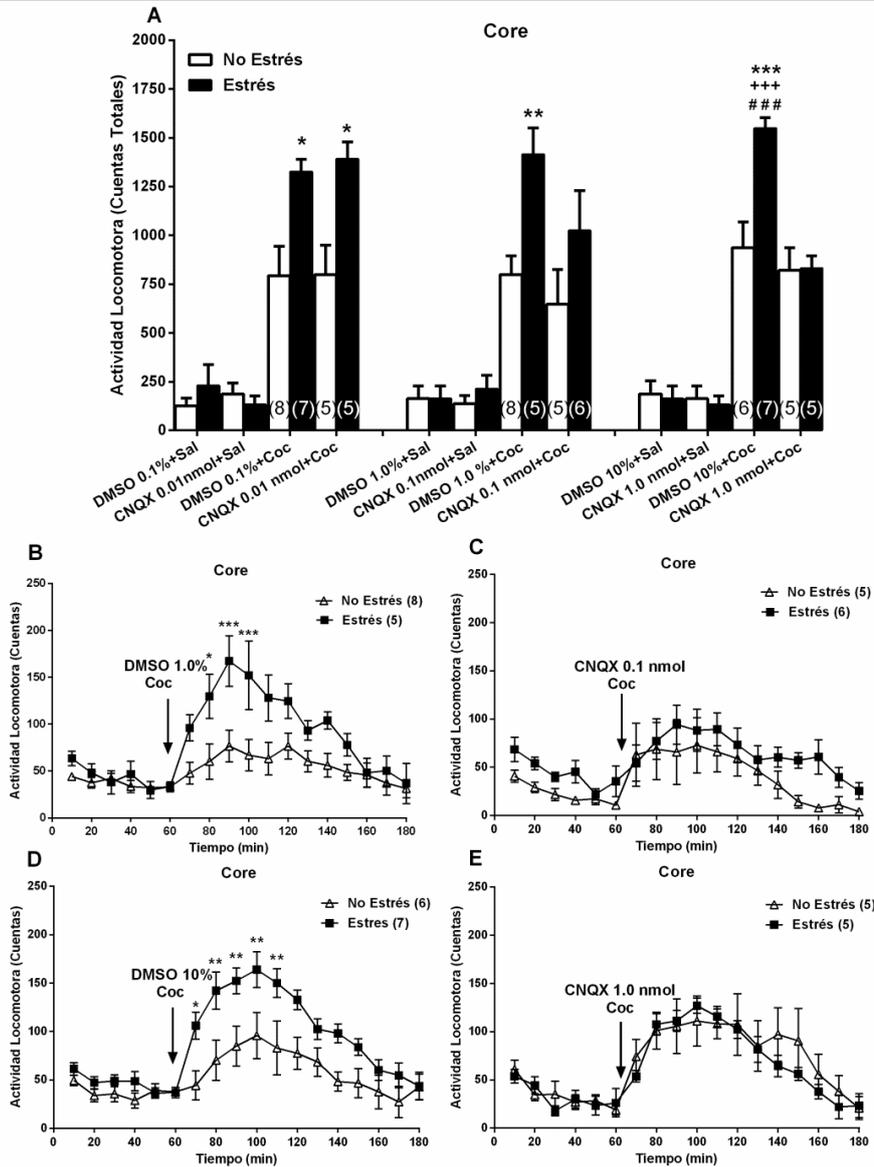


Figura 2.II. Efecto de la microinyección de antagonista AMPA en NA Core sobre la expresión de la sensibilización a las propiedades estimulantes de cocaína (15 mg/kg) en la actividad motora, tres semanas después del estrés agudo (A) Los valores representan las medias de las cuentas horizontales totales (\pm SEM) durante 120 min luego de la microinyección de CNQX (0.01, 0.1, 1.0 nmol) o DMSO (0.1, 1.0, 10%) y 5 min más tarde la inyección aguda de cocaína (15 mg/kg) o salina. *** p <0.001 comparado con el grupo no estrés/DMSO (10%); +++ p <0.001 comparado con el grupo estrés/CNQX (1 nmol), y ### p <0.001 comparado con el grupo no estrés/CNQX (1 nmol). **(B, C, D, E)** Los valores representan el promedio de cuentas \pm SEM en intervalos de 10 min, y corresponde a los mismos animales de la figura 2.II A. El período entre 10 y 60 min corresponde al tiempo de habituación de los animales previo a la microinyección de DMSO o CNQX y 5 min más tarde la inyección de cocaína. **(B)** Curso temporal de la actividad locomotora de animales microinyectados con DMSO (1.0%) e inyección de cocaína, * p <0.05 y *** p <0.001 comparado con el grupo no estrés, **(C)** CNQX (0.1 nmol) e inyección de cocaína; **(D)** DMSO (10%) e inyección de cocaína, * p <0.05 y ** p <0.01 comparado con el grupo no estrés, **(E)** CNQX (1.0 nmol) e inyección de cocaína. En los gráficos se detalla el número de animales por grupo.

Estos resultados concuerdan con el estudio farmacológico de Pierce y col, (1996) y experimentos de nuestro laboratorio (Esparza y col., 2012), los cuales demostraron que la microinyección previa de CNQX (1 nmol) en NAc Core, es capaz de bloquear la sensibilización conductual a cocaína en animales tratados ya sea con una administración previa repetida de la droga o con estrés crónico de 7 días como en el presente estudio.

Histología

En la figura 2.II F-G se representa la ubicación de las cánulas para la microinyección de vehículo DMSO (0.1, 1.0, 10%) y antagonista CNQX (0.01, 0.1, 1.0 nmol) en NAc Core y Shell, correspondiente a los animales que fueron incluidos en los análisis estadísticos.

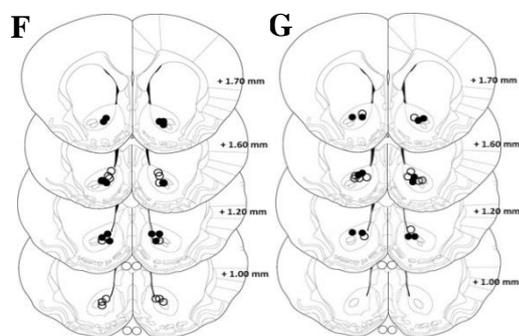


Figura 2.II F-G. Secciones esquemáticas del cerebro de rata, adaptadas del atlas de Paxinos y Watson, 2007. Los círculos vacíos corresponden a la ubicación de las cánulas en el grupo control y los círculos llenos denotan la ubicación de las cánulas en el grupo estrés. Figura F denota las microinyecciones de DMSO y figura G denota las microinyecciones de CNQX.

Conclusión Parcial

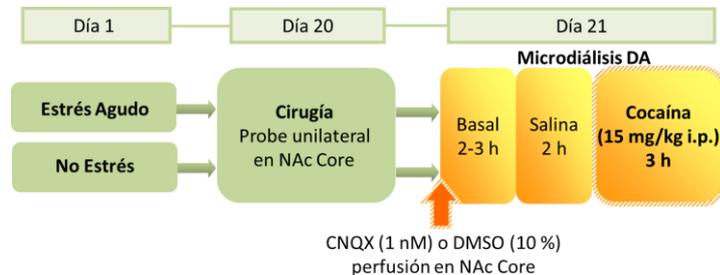
Estos resultados demuestran que los receptores AMPA en NAc Core participan de la expresión de la sensibilización cruzada a cocaína inducida por estrés por inmovilización, aplicado tres semanas antes de la microinyección del antagonista CNQX (1.0 nmol), el cual fue efectivo para bloquear la expresión del fenómeno de sensibilización cruzada a los efectos estimulantes motores de cocaína.

2.III. El Bloqueo de los receptores AMPA en NAc Core Previene el Aumento de la Liberación de DA luego de la Inyección Aguda de Cocaína en Animales Expuestos a Estrés Agudo.

Diseño Experimental

Tres semanas después del estrés los animales fueron operados e implantadas las *probes* de diálisis en NAc Core. Se esperó 24 hs a que los animales se recuperen y se

comenzó la diálisis con perfusión de CNQX (1 nM) o DMSO (10%) en el *buffer* de diálisis. Luego de establecer los niveles basales de DA, los animales recibieron una inyección de salina, se recolectaron muestras por 120 min con una inyección subsiguiente de cocaína (15 mg/kg), y muestras que se recolectaron por 180 min más.



Resultados

Consistentemente con los resultados obtenidos en el objetivo **1.II**, en la figura **2.III A** se observa la expresión de sensibilización a los efectos estimulantes de cocaína (15 mg/kg) sobre la liberación de DA en NAc Core en animales que fueron estresados por inmovilización veintidós días antes del experimento y recibieron en el *buffer* de diálisis vehículo o DMSO 10% durante la diálisis. La estadística en la figura **2.III A** demostró efecto de estrés, $F_{(1,15)}=5.05$, $p<0.05$ y de tiempo, $F_{(13,195)}=11.28$, $p<0.001$, como también de la interacción entre ambos, $F_{(13,195)}=1.92$, $*p<0.05$. El test de comparaciones múltiples (Bonferroni) arrojó diferencias significativas entre los grupos estrés y control, a los 30 y 120 min posteriores a la inyección aguda de cocaína 15 mg/kg, con un nivel de significancia de $*p<0.05$ y $**p<0.01$, respectivamente, indicando una mayor liberación de DA en los animales previamente estresados. El *t-test* realizado a los tiempos 240 min respecto de los 210 min del comienzo de la diálisis, demostró un efecto significativo en la liberación de DA luego de la inyección aguda de la droga en el grupo estrés $t\text{-test}_{16}=6.29$, $^{+++}p<0.001$. Efecto que también fue observado en el grupo no estrés $t\text{-test}_{14}=2.94$, $^{\#}p<0.05$ a los tiempos 240 min respecto de 210 min del comienzo de la diálisis.

Por otro lado, cuando los animales fueron perfundidos de forma constante con CNQX, un antagonista de los receptores AMPA, diluido en el *buffer* de diálisis se bloqueó el aumento de la liberación de DA observado en animales previamente estresados luego de la inyección aguda de cocaína (15 mg/kg), (Figura **2.III B**, efecto significativo del factor tiempo, $F_{(13,22)}=3.76$, $p<0.001$). Los *t-test* realizados indicaron que solo se observó el efecto de la inyección aguda de cocaína 15 mg/kg, a los tiempos 240 min respecto de los 210 min del

comienzo de la diálisis, lo cual evidenció un mayor efecto en la liberación de DA luego de la inyección aguda de la droga en el grupo estrés $t\text{-test}_{16}=2.46$, $^+p<0.05$. El efecto estimulante sobre la liberación de DA también fue observado en el grupo no estrés, $t\text{-test}_{18}=2.49$, $^{\#}p<0.05$ a los 240 min respecto de los 210 min del comienzo de la diálisis.

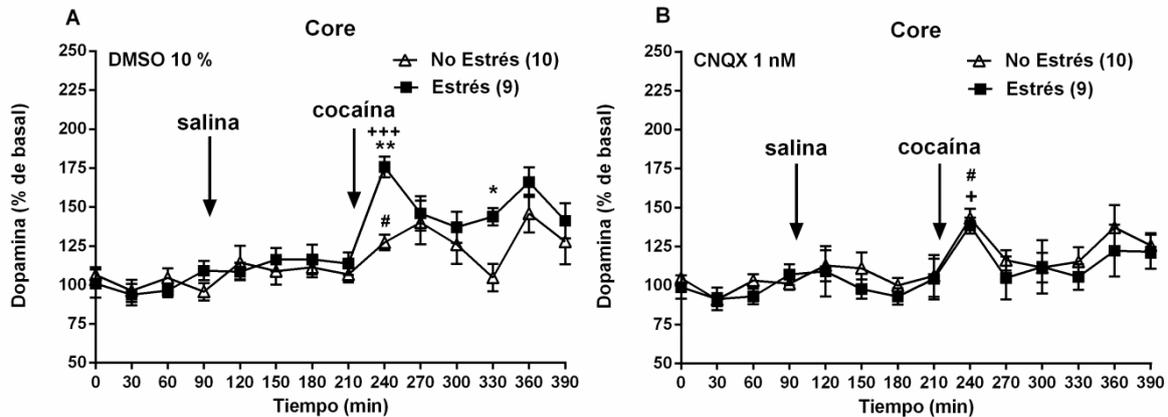


Figura 2.III. Efecto de CNQX en el *buffer* de diálisis sobre la liberación de DA luego de una inyección de cocaína (15 mg/kg) en NAc Core, tres semanas después del estrés agudo. Los valores representan el promedio (\pm SEM) del porcentaje de aumento de liberación de DA respecto de los niveles basales. Desde el comienzo se agregó al *buffer* de diálisis DMSO 10% o CNQX 1 nM y se mantuvo constante durante todo el experimento. El período de 0 a 90 min corresponde a las determinaciones basales de los niveles de DA. La inyección de salina fue administrada a los 90 min, y la inyección de cocaína (15 mg/kg) a los 210 min respecto del comienzo de la diálisis. Las muestras se colectaron cada 30 min a un flujo de 1 μ l/min. **(A)** DMSO 10%, $^{**}p<0.01$ comparado con el grupo no estrés y $^{+++}p<0.001$ comparado con los niveles basales del grupo estrés. $^{\#}p<0.05$ comparado con los niveles basales del grupo no estrés. **(B)** CNQX 1 nM, $^+p<0.05$ comparado con los niveles basales del grupo estrés. $^{\#}p<0.05$ comparado con los niveles basales del grupo no estrés. En los gráficos se indica el número de animales de cada grupo

Histología

En la figura 2.III C se representa la ubicación de las membranas activas de las *probes* de diálisis en NAc Core para la diálisis de DA correspondiente a los animales que fueron incluidos en los análisis estadísticos.

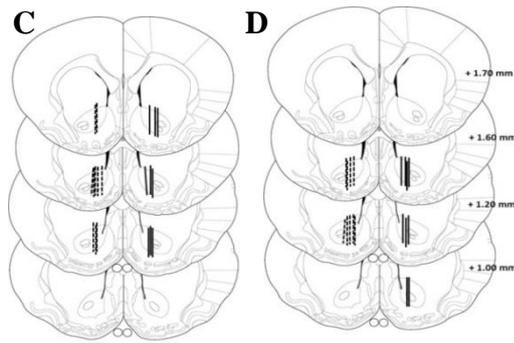


Figura 2.III C-D. Ilustración de donde se ubicaron las membranas activas de las *probes* de diálisis en NACore con el agregado de DMSO (C) o CNQX (D) a los diferentes *buffers* de diálisis, de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson, (2007). Las líneas punteadas denotan el grupo control, las líneas completas denotan el grupo estrés.

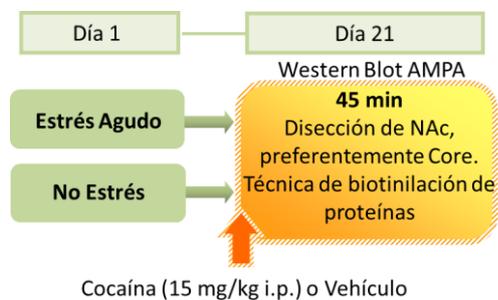
Conclusión Parcial

Estos resultados demuestran que los receptores AMPA dentro de NAc Core están implicados en la expresión de la sensibilización dopaminérgica inducida por estrés, ya que la perfusión de animales pre-estresados con un antagonista de los receptores AMPA en NAc Core, suprimió la expresión de la sensibilización a los efectos estimulantes de cocaína (15 mg/kg) sobre la liberación de DA en NAc Core.

2.IV. La Previa Exposición a Estrés Agudo por Inmovilización Indujo un Aumento en la Expresión de Superficie de la Subunidad GluR1 de los Receptores AMPA en NAc.

Diseño Experimental

Tres semanas después del estrés, los animales fueron decapitados 45 min después de la inyección aguda de cocaína (15 mg/kg) o salina. Los cerebros fueron rápidamente removidos y el NAc (principalmente Core) fue disecado para evaluar la expresión de superficie de la subunidad GluR1 utilizando la técnica de biotilación e inmunotransferencia.



Resultados

Se demostró el rol funcional de los receptores AMPA en la expresión de la sensibilización conductual por el agregado del agonista AMPA en NAc Core (objetivo **2.I**) y la reversión de la expresión conductual al efecto estimulante de cocaína (15 mg/kg) cuando se agrega CNQX el antagonista AMPA, intra-NAc Core (objetivo **2.II**). Utilizando la técnica de biotilación de proteínas de superficie, se evaluó la expresión de la subunidad GluR1 del receptor AMPA. Esta técnica permite obtener diferentes muestras dentro del procesamiento, como la fracción de superficie y la fracción total de AMPA, que permite inferir si hay síntesis de *novo* de proteínas o movilización de receptores hacia el espacio sináptico.

El análisis de la fracción de superficie, denota un aumento significativo en la expresión de la subunidad GluR1 del receptor AMPA en animales que fueron estresados tres semanas antes, sin observarse efecto por la inyección aguda de cocaína (15 mg/kg) o salina. La estadística fue realizada mediante un ANOVA de dos vías (estrés x droga), y los resultados denotaron diferencia significativa por estrés $F_{(1,16)}=9.25$, $p<0.01$. Los niveles de GluR1 en la fracción total no se vieron modificados en ninguno de los tratamientos, revelando que existiría una movilización de receptores a la superficie y no síntesis de *novo* de proteínas.

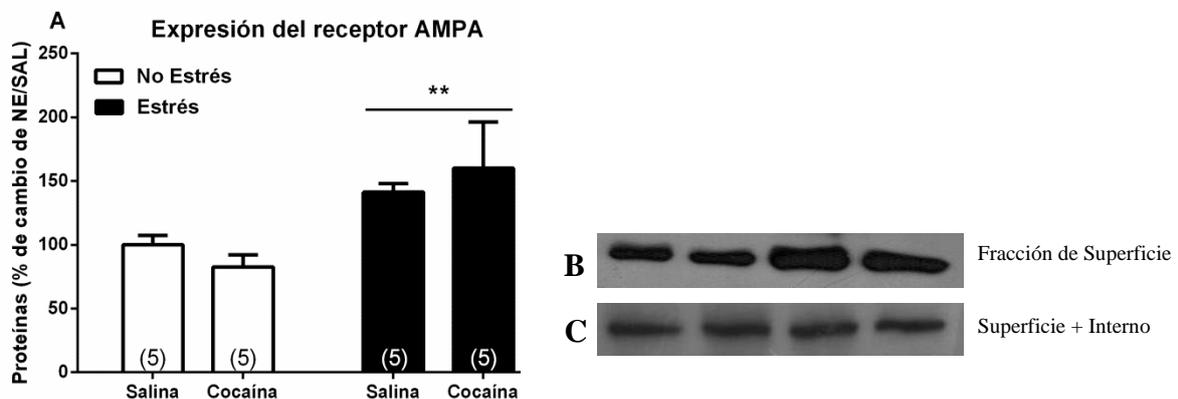


Figura 2.IV. Efecto en la expresión de superficie de la subunidad GluR1 del receptor AMPA en NAc, preferentemente Core, tres semanas después del estrés agudo. (A) Los valores representan las medias de las densidades ópticas \pm SEM, en los diferentes grupos tratados.. Los resultados se encuentran normalizados al 100% respecto de no estrés/SAL. En el gráfico se denota el número de animales por grupo. (B) Inmunotransferencia de proteínas correspondientes a la fracción de superficie y (C) fracción total (superficie e interno) de las muestras obtenidas de los diferentes grupos.

Conclusión Parcial

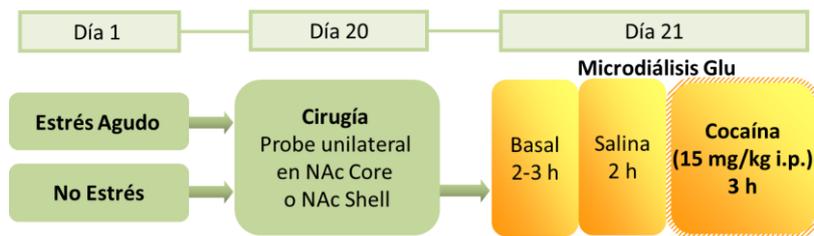
Estos resultados indican que la exposición a una sesión de estrés por inmovilización induce un aumento en la expresión de superficie de la subunidad GluR1 del receptor AMPA, la cual proviene de una movilización de receptor AMPA hacia el espacio sináptico, a las tres semanas después de la aplicación del estresor. Este efecto se asocia a la influencia del estrés previo y es independiente de la inyección aguda de salina o cocaína subsecuente.

3. Influencia de la Exposición a Estrés Agudo por Inmovilización en la Homeostasis Glutamatérgica de NAc Core y Shell, Basal y en Respuesta a Cocaína.

3.I. La Previa Exposición a Estrés Agudo Indujo un Aumento en la Liberación de Glu en NAc Core y Shell, Luego de la Inyección Aguda de Cocaína.

Diseño Experimental

Tres semanas después del estrés, los animales fueron operados y las *probes* de diálisis implantadas en NAc Core y Shell. Se dejó no menos de 24 hs para que los animales se recuperen y se comenzó la diálisis. Luego de establecer los niveles basales de Glu, los animales recibieron una inyección de salina, se recolectaron muestras por 120 min y una inyección subsiguiente de cocaína (15 mg/kg), con muestras que se recolectaron por 180 min más.



Resultados

Como se observa en la figura **3.I A** se produjo un aumento en la liberación de Glu en NAc Core inducido por cocaína (15 mg/kg). El *t-test* realizado a los tiempos 270 min respecto de los 210 min del comienzo de la diálisis, demostró que hay efecto en la liberación de Glu luego de la inyección aguda de la droga en el grupo estrés $t\text{-test}_{12}=3.01$, $^{++}p<0.01$. Efecto que también fue observado en el grupo no estrés $t\text{-test}_{14}=3.18$, $^{##}p<0.01$ a los tiempos 240 min respecto de 210 min del comienzo de la diálisis. Si bien se observó el aumento en la liberación de Glu por la inyección de cocaína, en el grupo que previamente fue expuesto a una sola sesión de estrés, el porcentaje de liberación de Glu es menor respecto al observado en el grupo no estrés. El análisis estadístico de la figura **3.I A**, arrojó diferencias significativas de estrés, $F_{(1,169)}=6.10$, $p<0.05$; de tiempo, $F_{(13,169)}=7.94$, $p<0.001$ y de la interacción entre ambos, $F_{(13,169)}=2.79$, $p<0.01$. El test de comparaciones múltiples

(Bonferroni) determinó que existen diferencias significativas entre los animales no estrés y estrés en la liberación de Glu a los 240 min de $*p<0.05$, y a los 330 y 360 min después del comienzo de diálisis de $**p<0.01$. La menor estimulación de la liberación de Glu inducida por cocaína en los animales previamente sometidos a estrés puede atribuirse a que, los valores basales iniciales de Glu en NAc Core fueron mayores en el grupo estrés con respecto al no estrés y, por lo tanto, el porcentaje de aumento de la liberación de Glu inducido por la droga con respecto del basal, arrojó un resultado de menor magnitud en dicha liberación en el grupo estrés con respecto al no estrés.

Por el contrario, cuando se evaluó en NAc Shell el porcentaje de liberación de Glu frente a una dosis desafío de cocaína de 15 mg/kg solo se encontró efecto de tiempo, $F_{(13,143)}=5.07$ y $p<0.001$, sin observarse diferencias significativas entre los grupos estrés y no estrés (figura 3.I B). El *t-test* realizado *a posteriori* en los tiempos 240 min respecto de los 210 min del comienzo de la diálisis, demostró que hay efecto en la liberación de Glu luego de la inyección aguda de la droga en el grupo estrés $t\text{-test}_{10}=2.23$, $^+p<0.05$. Este efecto fue también observado en el grupo no estrés $t\text{-test}_{12}=2.38$, $^{\#}p<0.05$ a los tiempos 240 min respecto de 210 min del comienzo de la diálisis.

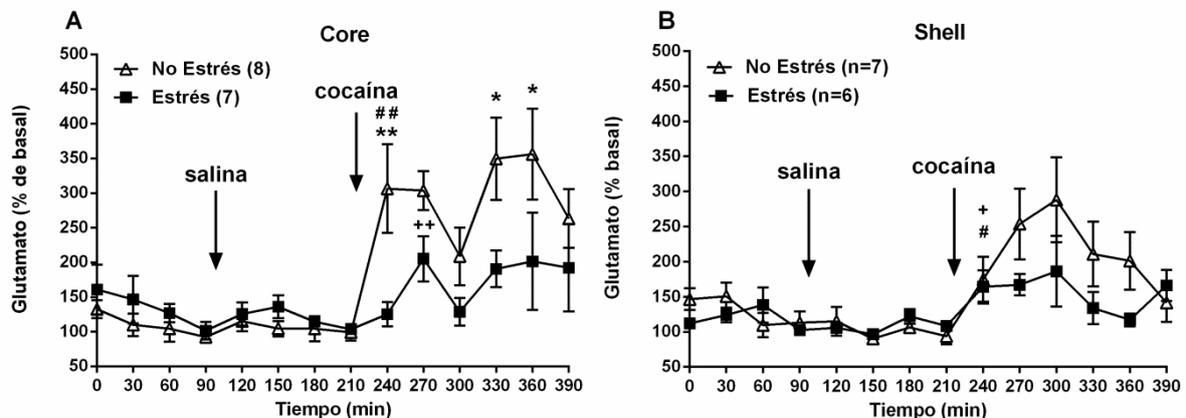


Figura 3.I. Efecto estimulante de cocaína (15 mg/kg) sobre la liberación de Glu en NAc Core y Shell, tres semanas después del estrés agudo. En los gráficos se representa el promedio (\pm SEM) del porcentaje de aumento de liberación de Glu respecto de los niveles basales. El período de 0 a 90 min corresponde a las determinaciones basales de los niveles de Glu. La inyección de salina fue administrada a los 90 min, y la inyección de cocaína (15 mg/kg) a los 210 min respecto del comienzo de la diálisis. Las muestras se colectaron cada 30 min a un flujo de 1 μ l/min. En los gráficos se indica el número de animales de cada grupo. (A) NAc Core, $**p<0.01$ comparado con el grupo estrés y $^{\#}p<0.01$ comparado con los niveles basales del grupo no

estrés. ⁺⁺ $p < 0.01$ comparado con los niveles basales del grupo estrés. **(B)** NAc Shell, ⁺ $p < 0.05$ comparado con los niveles basales del grupo estrés. [#] $p < 0.05$ comparado con los niveles basales del grupo no estrés.

Niveles Basales de Glu

Los valores basales de Glu para cada grupo experimental fueron expresados en pmol/muestra. Se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, $t\text{-test}_{(59)} = 3,18, p < 0.05$.

Estructura	No Estrés (pmol/muestra)	Estrés (pmol/muestra)
NAc Core	8,33 ± 0,84	15,46 ± 1,97*
NAc Shell	11,72 ± 2,35	15,32 ± 3,15

Tabla II. Niveles basales de Glu expresados en pmol/muestra, descritos como las medias ± SEM. Los valores corresponden a los cuatro valores basales de Glu obtenidos de los grupos de animales del experimento anterior.

Histología

En la figura **3.I C** se representan las ubicaciones de las membranas activas de las *probes* de diálisis en NAc Core y Shell para la diálisis de Glu correspondiente a los animales que fueron incluidos en los análisis estadísticos.

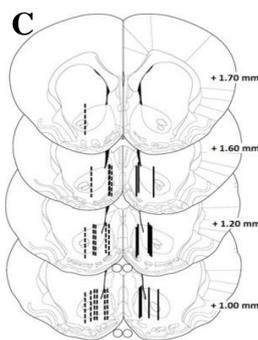


Figura 3.I C. Ilustración de donde se ubican las membranas activas de las *probes* de diálisis en NAc Core y Shell para la diálisis de Glu, de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson, (2007). La línea punteada corresponde a las *probes* de los animales controles, las líneas completas corresponde a las *probes* de los animales estrés.

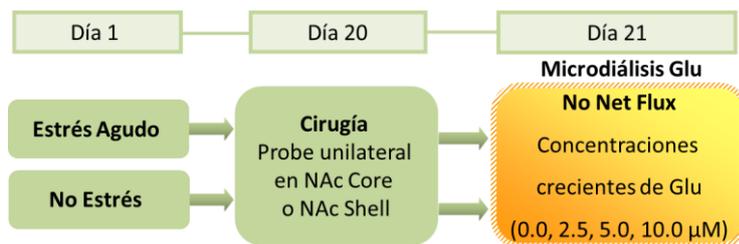
Conclusión Parcial

Estos resultados indican que la exposición a una sola sesión de estrés por inmovilización atenúa el aumento inducido por cocaína sobre la liberación de Glu en el NAc Core, pero no Shell, a las tres semanas después de la aplicación del estresor.

3.II. La Previa Exposición a Estrés Agudo Indujo Aumento en los Niveles Basales de Glu en NAc Core, pero no en Shell.

Diseño Experimental

En otro experimento, tres semanas después del estrés, los animales con las probes de diálisis implantadas en NAc Core y Shell fueron dializados con la técnica de *No Net Flux* utilizada específicamente para la determinación de los niveles basales de Glu. La perfusión del *buffer* de diálisis comenzó a través de la *probe* de diálisis con una concentración baja de Glu, y continuó con concentraciones crecientes de Glu (0.0, 2.5, 5.0, 10.0 μM). Cada una de las concentraciones fue dializada durante 2 hs, obteniéndose 4 muestras por dializado.



Resultados

En la figura **3.II A** se observan los valores basales de Glu en NAc Core en ambos grupos de animales, no estrés y estrés. La intersección con el eje x se corresponde con la concentración de Glu extracelular basal que fue extrapolada de la línea de regresión lineal y es diferente entre los grupos, no estrés= $2.09 \pm 0.63 \mu\text{M}$ y estrés= $5.33 \pm 1.24 \mu\text{M}$. Los datos fueron analizados por $t\text{-test}_{16}=2.148$, $*p<0.05$, indicando un aumento significativo en los valores basales de Glu extracelular en el grupo estrés con respecto al control. Considerando que las pendientes de la regresión lineal no son diferentes entre los grupos no estrés= 1.03 ± 0.11 y estrés= 1.26 ± 0.21 , la diferencia entre ambos no puede atribuirse a una alteración del *clearance* de Glu en el grupo estrés. En la figura **3.II B** se observa que en NAc Shell, tanto los valores basales de Glu en el grupo no estrés= $1.04 \pm 0.11 \mu\text{M}$, como el grupo estrés= $1.23 \pm 0.19 \mu\text{M}$, y la pendiente de la regresión lineal (no estrés= 0.94 ± 0.03 y estrés= 1.02 ± 0.03) no difieren entre ambos grupos (estrés y no estrés).

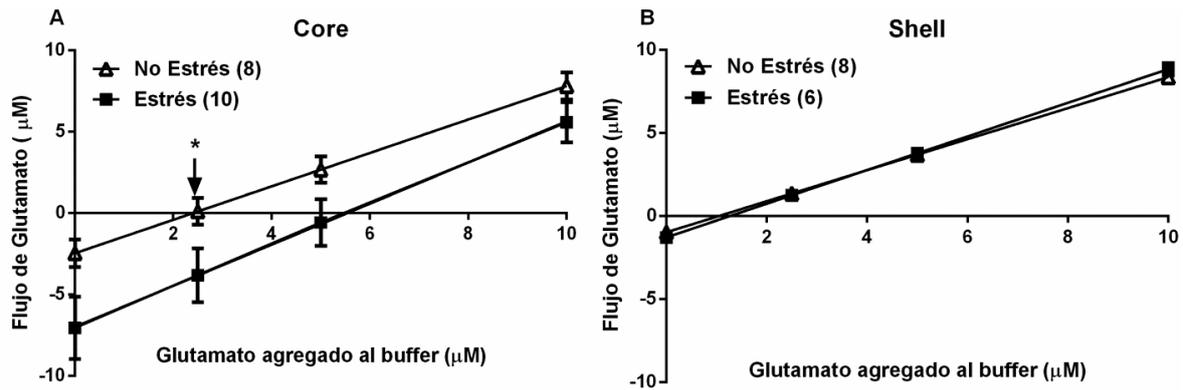


Figura 3.II. Efecto de la exposición a una sesión de estrés sobre los Niveles Basales de Glu Extracelular en NAc Core y Shell, tres semanas después del estrés agudo. En los gráficos se representa el promedio (\pm SEM) del punto de flujo neto de Glu (eje-y) que es la diferencia entre la concentración de Glu dializada de la recuperada del cerebro. Las muestras se colectaron cada 30 min, a un flujo de 1 μ l/min y cada concentración de Glu agregada al *buffer* se dializó durante 2 hs (0, 2.5, 5.0, 10.0 μ M). En los gráficos se indica el número de animales en cada grupo. (A) NAc Core, * $p < 0.05$ comparado con los niveles basales de Glu del grupo estrés. (B) NAc Shell.

Histología

En la figura 3.II C se representa la ubicación de las membranas activas de las *probes* de diálisis en NAc Core y Shell para la diálisis de Glu correspondiente a los animales que fueron incluidos en los análisis estadísticos.

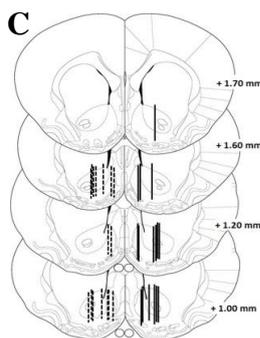


Figura 3.II C. Ilustración de donde se ubican las membranas activas de las *probes* de diálisis en NAc Core y Shell para la diálisis de Glu, de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (2007). La línea punteada corresponde a las *probes* de los animales controles, las líneas completas corresponde a las *probes* de los animales estrés.

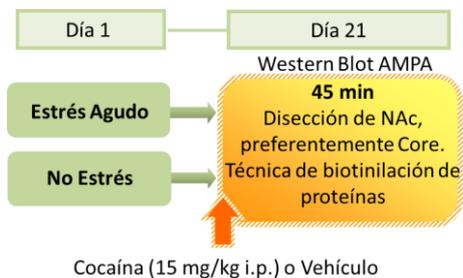
Conclusión Parcial

Estos resultados indican que la exposición a una sola sesión de estrés por inmovilización indujo un aumento en los niveles basales de Glu extracelular en Core, pero no en Shell, a las tres semanas después de la aplicación del estresor.

3.III. La Previa Exposición a Estrés Agudo Indujo una Disminución en la Expresión del Transportador Glutamatérgico GLT-1 en la Fracción de Gliosoma.

Diseño Experimental

Tres semanas después del estrés, los animales fueron inyectados con salina o cocaína (15 mg/kg), sacrificados 45 min más tarde y evaluados para determinar la expresión del transportador GLT-1 en la fracción enriquecida de gliosoma [separación de fracciones por gradientes de Percoll (Dunkey y col., 2008)] en tejido de NAc, preferentemente Core.



Resultados

Tres semanas después del estrés por inmovilización se observó una disminución en la expresión del transportador GLT-1 en el NAc (preferentemente Core) de animales previamente estresados, independiente de la dosis aguda de salina o cocaína (15 mg/kg) que hayan recibido, como se observa en la figura 3.III. Los resultados fueron analizados por ANOVA de dos vías (estrés x droga), arrojando una diferencia significativa solo por efecto de estrés $F_{(1,12)}=4.76$, $p<0.01$ y no por efecto de la inyección aguda de droga. De acuerdo con los resultados obtenidos de la expresión de GLT-1 podemos inferir que esta podría ser la causa del aumento en los niveles basales de Glu extracelular encontrados en Core, pero no en Shell, y también la razón por la cual frente a la dosis aguda de cocaína la liberación de Glu en NAc Core se encontró atenuada en los animales que tuvieron una sola sesión de estrés por inmovilización. Del mismo modo, Baker y col (2002), demostró que mediante la inhibición del transportador GLT-1, los niveles basales de Glu extracelular se elevan cinco veces más con respecto a los observados en los animales controles.

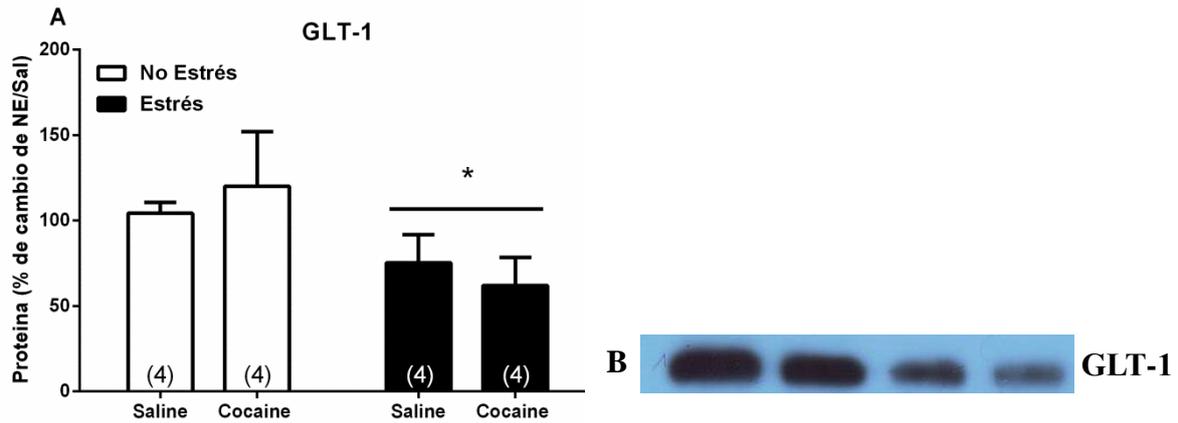


Figura 3.III. Efecto de la exposición a una sesión de estrés sobre la expresión del transportador glutamatergico GLT-1 en NAc, preferentemente Core, tres semanas después del estrés agudo. (A) Los valores representa las medias de las densidades ópticas \pm SEM, en los diferentes grupos tratados. Los resultados se encuentran normalizados al 100% respecto del grupo no estrés/SAL. En el gráfico se denota el número de animales por grupo. **(B)** Inmunotransferencia de proteínas correspondiente a la fracción de gliosoma de NAc obtenidas de los diferentes grupos.

Conclusión Parcial

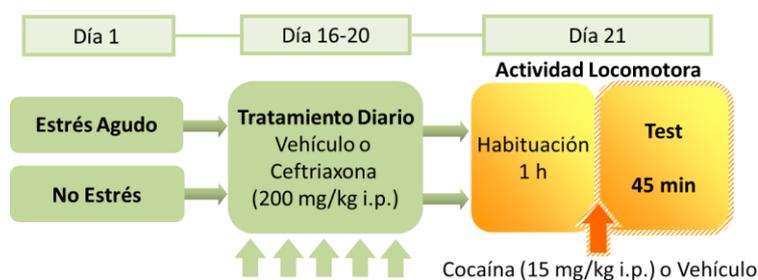
Estos resultados indican que una sola sesión de estrés por inmovilización indujo una disminución en la expresión del transportador glutamatergico GLT-1 en la fracción de gliosoma de NAc, preferentemente Core, a las tres semanas después de la aplicación del estresor. La subsecuente inyección aguda de salina o cocaína no modificó la influencia de estrés sobre la expresión de GLT-1.

4. Influencia del Tratamiento Previo de Ceftriaxona sobre la Expresión de la Sensibilización Inducida por Estrés Agudo por Inmovilización, a las Propiedades Estimulantes Motoras de Cocaína y los Cambios en la Homeostasis Glutamatérgica Asociados: Medidos por Determinación Neuroquímica (captación de Glu en NAc Core) y Registros Electrofisiológicos de Funcionalidad de la Pre y Post-sinapsis [Desborde (*Spillover*) de Glu y Relación de las Corrientes AMPA/NMDA].

4.I. El Tratamiento Previo de Ceftriaxona Previene la Expresión de la Sensibilización Cruzada a Estrés y Cocaína.

Diseño experimental

Dos semanas después del estrés, los animales recibieron inyecciones por 5 días consecutivos de Ceftriaxona (200 mg/kg i.p.) o Vehículo (salina). Al día veintiuno después del estrés los animales fueron habituados durante 1 h a las cajas de registro de actividad locomotora; luego recibieron una inyección de cocaína (15 mg/kg) o salina, y la respuesta conductual fue monitoreada durante 45 min en intervalos de 10 min.



Resultados

En la figura 4.I A podemos ver cómo la expresión de la sensibilización a cocaína (15 mg/kg) inducida por estrés por inmovilización tres semanas antes de la dosis aguda de cocaína, es bloqueada después del pre-tratamiento de Ceftriaxona durante 5 días (a partir del día dieciséis y hasta el día veinte). Los datos fueron analizados por un ANOVA de dos vías (estrés x tratamiento) y revelaron efecto de estrés, $F_{(1,41)}=7.85$, $p<0.01$, de tratamiento $F_{(1,41)}=8.36$, $p<0.01$ y de interacción entre ambos, $F_{(1,41)}=4.08$, $p<0.05$. Comparaciones *post-hoc* de Bonferroni indicaron que las cuentas totales correspondientes a 45 min después de la

inyección de salina o cocaína demostraron una diferencia significativa del grupo estrés/VEH con respecto a los grupos no estrés/VEH, $**p<0.01$, a estrés/CEF, $^{++}p<0.01$ y no estrés/CEF, $^{##}p<0.01$.

En la figura **4.I B-C** se observa el curso temporal después de la inyección de cocaína de 15 mg/kg de animales previamente estresados y controles, con el tratamiento de vehículo o Ceftriaxona. Estos datos fueron analizados por ANOVA de dos vías (estrés x tiempo) con muestras repetidas. En la figura **4.I B** se demostró que la administración previa de 5 días de vehículo no modificó la expresión de la sensibilización cruzada a cocaína (la estadística reveló efecto de estrés, $F_{(9,21)}=5.68$, $p<0.05$, de tiempo, $F_{(9,189)}=25.26$, $p<0.001$, y de la interacción entre ambos $F_{(9,189)}=2.03$, $p<0.05$), ni tampoco el efecto agudo de cocaína 15 mg/kg en ambos grupos animales (*t-test* realizado *a posteriori* en los tiempos 70 min respecto de los 60 min desde el comienzo del registro de actividad locomotora, demostrándose que hay un aumento de la actividad luego de la inyección aguda de la droga en el grupo estrés *t-test*₂₂=6.09, $^{+++}p<0.001$, y no estrés *test*₂₂=5.09, $^{##}p<0.01$). Además, el test de comparaciones múltiples de Bonferroni indicó diferencias significativas de $**p<0.01$ entre no estrés/VEH y estrés/VEH a los 70 min del comienzo del registro de la actividad locomotora, y también a los 80 min con una diferencia significativa de $*p<0.05$. El pre-tratamiento de Ceftriaxona (figura **4.I C**) bloqueó la expresión del fenómeno de sensibilización cruzada aunque no modificó el efecto agudo de la droga. La estadística demostró efecto de tiempo $F_{(9,180)}=5.56$, $p<0.001$ y el *t-test* realizado *a posteriori* en los 70 min respecto de los 60 min desde el comienzo del registro de actividad locomotora, demostró un aumento de la actividad luego de la inyección aguda de la droga en el grupo estrés *t-test*₂₀=3.71, $^{+}p<0.05$, y no estrés *test*₂₀=2.08, $^{#}p<0.05$. Del mismo modo, Rasmussen y col. (2011) reportaron que utilizando la misma dosis de Ceftriaxona se bloqueó la expresión de la sensibilización conductual a anfetamina en animales con administración repetida de anfetamina, sin observarse cambios del efecto agudo de la droga.

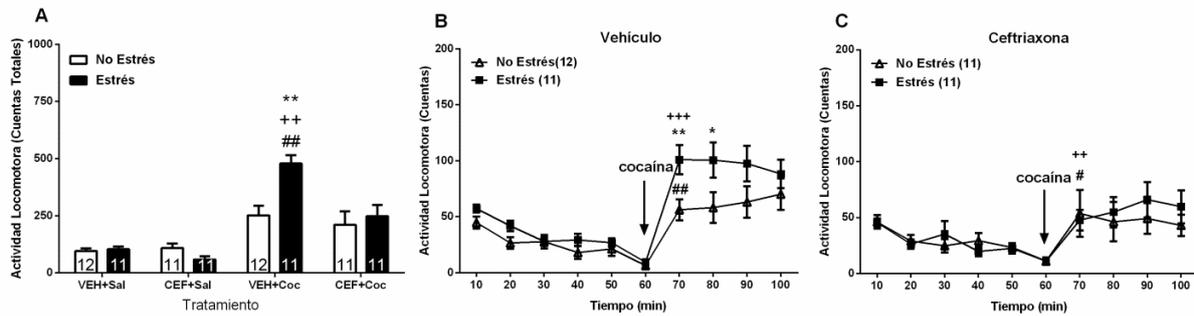


Figura 4.I. Efecto del tratamiento con Ceftriaxona sobre la expresión de la sensibilización a las propiedades estimulantes de cocaína (15 mg/kg) sobre la actividad motora, tres semanas después del estrés agudo. (A) Los valores representan las medias de las cuentas horizontales totales (\pm SEM) durante 120 min luego de la inyección de salina o cocaína (15 mg/kg). $**p < 0.01$ comparado con el grupo no estrés/VEH; $^{++}p < 0.01$ comparado con el grupo estrés/CEF y $^{##}p < 0.01$ comparado con el grupo no estrés/CEF. (B, C) Los valores representan el promedio de cuentas \pm SEM en intervalos de 10 min, y corresponde a los mismos animales de la figura 4.I A. El período entre 10 y 60 min corresponde al tiempo de habituación de los animales previo a la inyección de cocaína (15 mg/kg). (B) Curso temporal de la actividad locomotora de animales tratados con vehículo e inyectados con cocaína (15 mg/kg). $**p < 0.01$ comparado con el grupo no estrés; $^{+++}p < 0.001$ comparado con las cuentas del final de la habituación del grupo estrés; $^{##}p < 0.01$ comparado con las cuentas del final de la habituación del grupo no estrés (C) Curso temporal de la actividad locomotora de animales tratados con ceftriaxona e inyectados con cocaína (15 mg/kg). $^{+}p < 0.05$ comparado con las cuentas del final de la habituación del grupo estrés; $^{#}p < 0.05$ comparado con las cuentas del final de la habituación del grupo no estrés. En los gráficos se indica el número de animales por grupo.

Conclusión Parcial

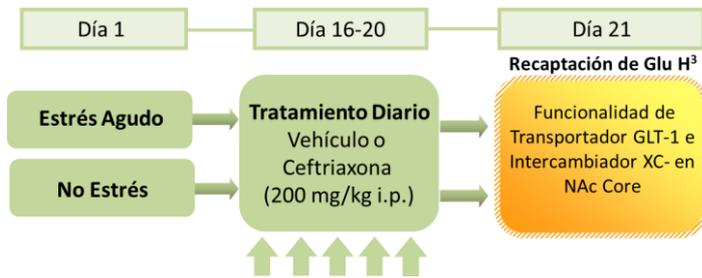
Estos hallazgos indican que la expresión de la sensibilización cruzada inducida por estrés a las propiedades estimulantes motoras de cocaína es suprimida por el tratamiento diario con ceftriaxona cinco días antes de la administración de la droga.

4.II. El Tratamiento Previo de Ceftriaxona Revirtió la Disminución de la Actividad del Transportador GLT-1 Inducido por Estrés Agudo.

Diseño Experimental

Dos semanas después del estrés, los animales recibieron inyecciones por 5 días consecutivos de Ceftriaxona (200 mg/kg i.p.) o Vehículo (salina). Al día veintiuno después del estrés los animales fueron sacrificados, el NAc, preferentemente Core, disecado y se

evaluó la actividad del transportador GLT-1 y del intercambiador XC-. En ambos experimentos los animales no recibieron inyección aguda de cocaína o salina.



Resultados

Dado que el tratamiento con Ceftriaxona bloqueó la expresión de la sensibilización conductual a cocaína (objetivo **4.I**) decidimos evaluar la actividad del transportador GLT-1 luego del tratamiento de Ceftriaxona en animales que fueron previamente estresados. En la figura **4.II** se encuentra representada la actividad del transportador GLT-1, a partir del Glu dependiente de Na⁺, y la actividad del intercambiador Xc-, a partir del Glu independiente de Na⁺, en el NAc Core. Un ANOVA de dos vías (estrés x tratamiento) reveló efecto de estrés, $F_{(1,20)}=10.0$, $p<0.01$ y de tratamiento $F_{(1,20)}=5.35$, $p<0.05$, así como la interacción entre ambos factores $F_{(1,20)}=4.80$, $p<0.05$. El test de comparaciones múltiples de Bonferroni, determinó una diferencia significativa entre los grupos no estrés/VEH y estrés/VEH (** $p<0.01$) lo que demuestra que la actividad de GLT-1 se encontró significativamente disminuida en animales previamente estresados y esta disminución fue revertida por el tratamiento de 5 días de Ceftriaxona. Además, se demostró diferencia significativa entre los grupos estrés/VEH y no estrés/CEF (^{##} $p<0.01$) y de los grupos estrés/VEH respecto de estrés/CEF (⁺ $p<0.05$) evidenciando el efecto del pre-tratamiento de Ceftriaxona. Por otro lado, se desprende del gráfico que la actividad del intercambiador Xc- no se vio afectada por el estrés previo, ni por el tratamiento con Ceftriaxona.

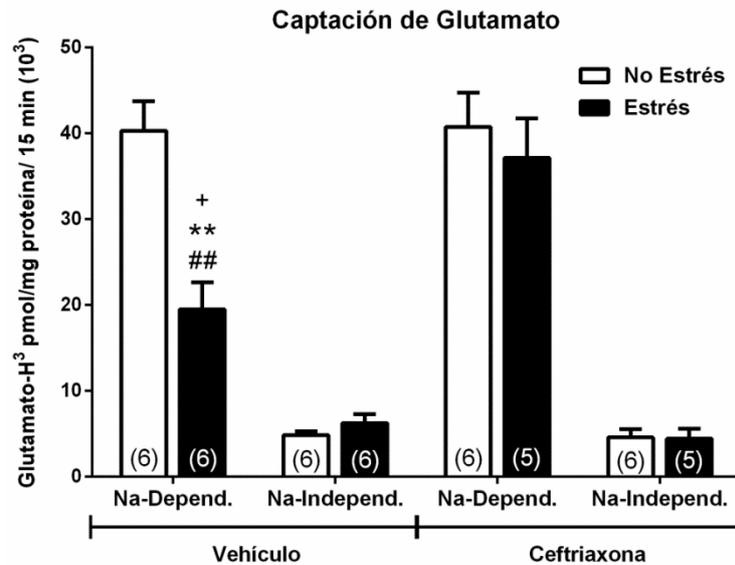


Figura 4.II. Efecto del tratamiento con Ceftriaxona en la actividad de GLT-1 y Xc-, tres semanas después del estrés agudo. Los valores representan el promedio (\pm SEM) de la captación de Glutamato- H^3 en pmol por mg de proteínas en 15 min de reacción. ** $p < 0.01$ comparando con el grupo no estrés/VEH; + $p < 0.05$ comparando con el grupo estrés/CEF y ## $p < 0.01$ comparado con el grupos estrés/CEF. En el gráfico se denota el número de animales por grupo.

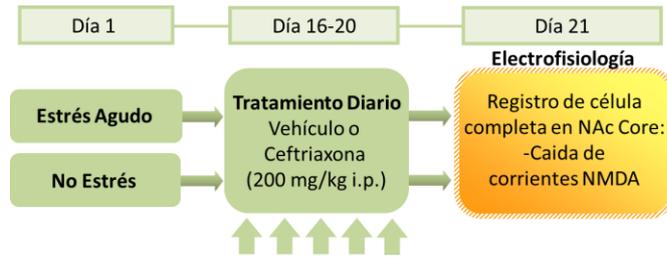
Conclusión Parcial

Estos resultados indican que una sola sesión de estrés por inmovilización induce una disminución en la actividad del transportador glutamatérgico GLT-1, dependiente de Na^+ , en NAc Core, la cual es revertida por el tratamiento previo de cinco días de Ceftriaxona. Por otro lado, la actividad del intercambiador Xc-, no dependiente de Na^+ , no se vio afectada por la sesión de estrés, ni por el tratamiento con Ceftriaxona.

4.III. El Tratamiento Previo de Ceftriaxona Revirtió el Desborde (*Spillover*) de Glu Inducido por Estrés Agudo.

Diseño Experimental

Dos semanas después del estrés, los animales recibieron inyecciones por 5 días consecutivos de Ceftriaxona (200 mg/kg i.p.) o Vehículo (salina). Al día veintiuno después del estrés los animales fueron sacrificados, se realizaron cortes coronales conteniendo NAc y las aferentes de CPfr dorsal, y se registró el decaimiento de los potenciales de las corrientes NMDA en las células completas MSN de Core.



Resultados

Utilizando la técnica de electrofisiología, se analizó el retardo en los tiempos de caída de las corrientes NMDA que es considerado como un índice del efecto desborde (*spillover*) de Glu, reflejo de una menor recaptación de Glu. En la figura 4.III A-B se observa que el decaimiento de las corrientes excitatorias postsinápticas (EPSCs) de los receptores NMDA compuesto por la subunidad GluNR2B, luego de 1-8 pulsos de estimulación en cortes de tejido que contienen NAc Core, son más lentas en animales previamente estresados que fueron tratados con VEH durante 5 días. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías (estrés x número de pulsos) y se encontraron diferencias significativas de efecto de estrés, $F_{(1,40)}=8.17$, $p<0.01$ y número de pulsos, $F_{(3,40)}=26.67$, $p<0.001$. Este resultado, en conjunto con los obtenidos anteriormente muestra que el aumento de Glu basal en animales que fueron previamente estresados, por disminución de la expresión y actividad del transportador GLT-1, facilita el desborde (*spillover*) de Glu que se encuentra presente por más tiempo en el espacio sináptico y extrasináptico activando los receptores NMDA. Estos receptores con la subunidad GluNR2B, se encuentran en mayor proporción en la perisinápsis (donde se encuentra el principal transportador, GLT-1), por lo tanto permite inferir que hay un desborde (*spillover*) de Glu en animales que fueron previamente estresados. El efecto sobre el desborde de (*spillover*) Glu fue atenuado por el tratamiento de 5 días con Ceftriaxona.

Es importante destacar que en algunos tratamientos se demostró que la subunidad GluNR2B del receptor NMDA se encuentra aumentada luego de la autoadministración de heroína o nicotina y lo propusieron como mecanismo importante en el inicio de la recaída. En efecto, cuando se microinyectó el antagonista del receptor NMDA-GluNR2B, Ifenprodil, se bloqueó la reinstalación en la búsqueda de estas drogas (Shen, y col., 2011; Gipson y col., 2013). Por lo tanto, para independizarnos de la expresión de esta subunidad del receptor

NMDA en los diferentes grupos tratados (estrés y no estrés) los datos fueron normalizados al incremento neto luego de un pulso de estimulación.

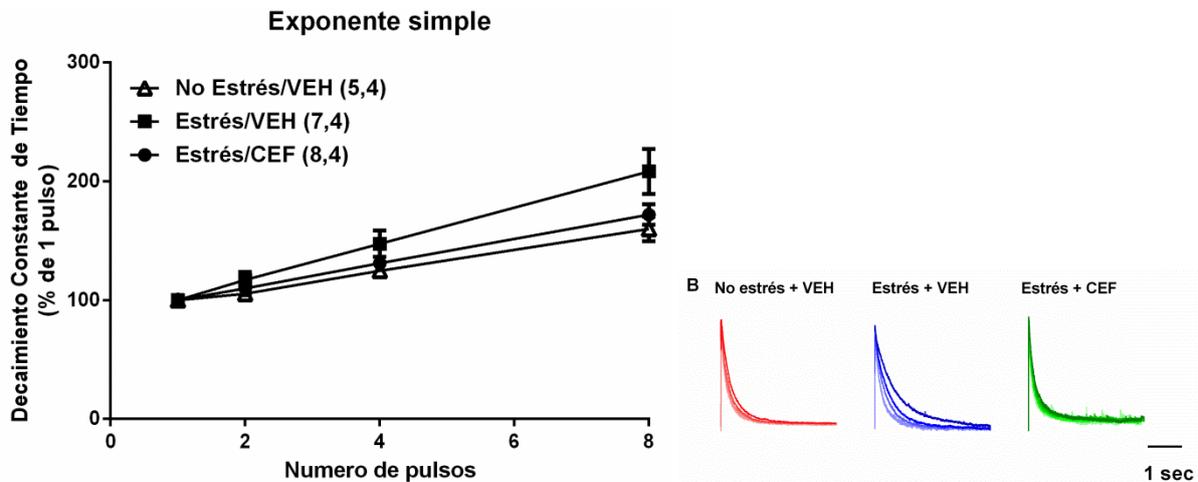


Figura 4.III. Efecto del tratamiento de Ceftriaxona sobre el desborde (*spillover*) de Glu sináptico, tres semanas después del estrés agudo. (A) Los valores corresponden a la media (\pm SEM) del decaimiento de las corrientes de los receptores NMDA a los distintos pulsos de estimulación en los diferentes grupos tratados. El gráfico está normalizado al decaimiento de un pulso de estimulación, y se indica el número de células registradas y animales. (B) Caída de los EPSC de los receptores NMDA disparados por los diferentes pulsos de estimulación de cada grupo de la figura 4.III A, los registros EPSC de NMDA están normalizados a un pulso de estimulación.

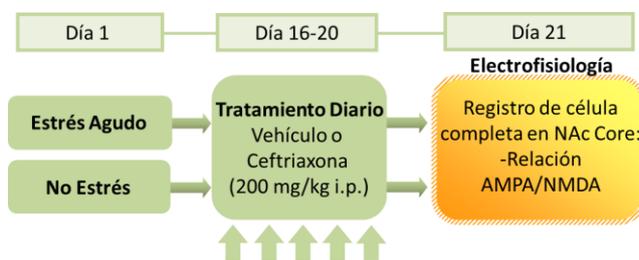
Conclusión Parcial

*Estos resultados indican que una sola sesión de estrés por inmovilización produjo un retardo en el decaimiento de las corrientes NMDA, efecto que se considera como un índice del efecto desborde (*spillover*) de Glu que proviene de una menor recaptación de Glu. En otras palabras, se observó un efecto desborde (*spillover*) de Glu registrado en NAc Core en animales pre-estresados, luego de la estimulación en Corteza Prefrontal Dorsal. El retardo en el decaimiento de las corrientes de NMDA fue atenuado por el tratamiento con Ceftriaxona durante 5 días en estos animales previamente estresados*

4.IV. El Tratamiento Previo de Ceftriaxona No Modificó el Aumento de la Relación de las Corrientes AMPA/NMDA Inducido por Estrés Agudo.

Diseño Experimental

Dos semanas después del estrés, los animales recibieron inyecciones por 5 días consecutivos de Ceftriaxona (200 mg/kg i.p.) o Vehículo (salina). Al día veintiuno después del estrés los animales fueron sacrificados, se realizaron cortes coronales conteniendo NAc y las aferentes de CPfr dorsal, y se registró la actividad de los receptores AMPA y NMDA en células completas del tipo MSN de Core estableciéndose la relación entre ambas.



Resultados

Utilizando la técnica de electrofisiología, se registró las corrientes de los picos AMPA y NMDA aislando cada una de ellas y se estableció la relación de picos como una medida de plasticidad sináptica (Malenka y Bear, 2004). La figura **4.IV A-B** muestra un aumento de la fuerza sináptica (aumento de la relación de las corrientes AMPA/NMDA) en los animales bajo la condición estrés y el análisis estadístico de ANOVA de una vía (no estrés/VEH, estrés/VEH, estrés/CEF) arrojó diferencias significativas de efecto de estrés $F_{(2,41)}=8.13$, $p<0.01$, en tanto que el tratamiento de 5 días de Ceftriaxona no fue suficiente para normalizar la fuerza sináptica observada en la condición estrés. El análisis de comparaciones múltiples Bonferroni reveló diferencias entre los grupos no estrés/VEH de estrés/VEH, $**p<0.01$, y no estrés/VEH de estrés/CEF, $**p<0.01$. Este resultado se encuentra en relación con los resultados obtenidos de la expresión de superficie del receptor AMPA y la expresión de la sensibilización conductual por microinyección del agonista AMPA en Core, en animales que habían sido expuestos a una sesión de estrés, tres semanas antes de los experimentos.

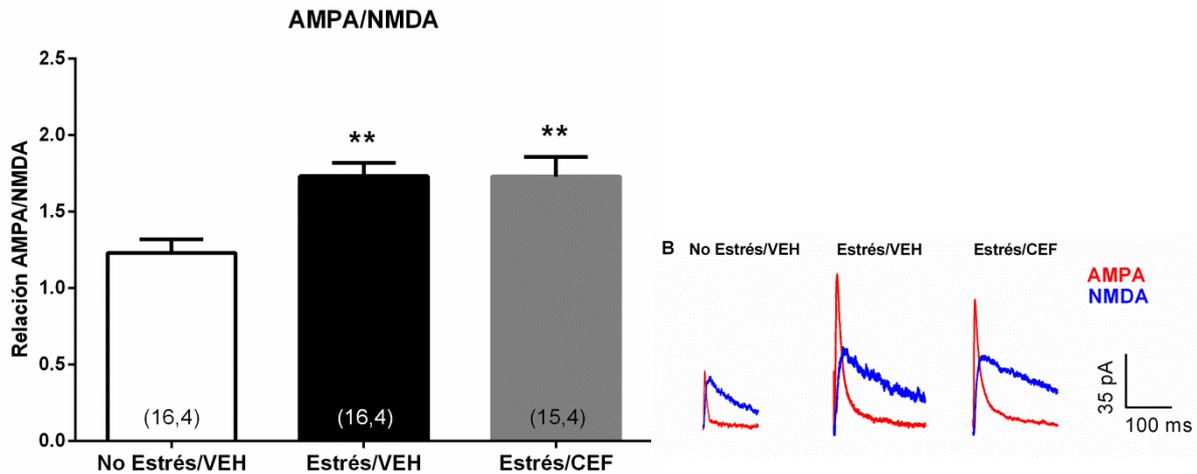


Figura 4.IV. Efecto del tratamiento de Ceftriaxona sobre la relación de las corrientes AMPA/NMDA, tres semanas después del estrés agudo. (A) En el gráfico se observa la media (\pm SEM) de la relación de las corrientes AMPA/NMDA en los diferentes grupos tratados. En el gráfico se encuentra denotado el número células registradas y de animales por grupo. $**p < 0.01$ comparando con el grupo no estrés/VEH (B) Corrientes de AMPA y NMDA de cada grupo de animales de la figura 4.IV A. Calibración: 100 ms, 35 pA.

Conclusión Parcial

Estos resultados indican que una sola sesión de estrés por inmovilización tres semanas antes llevo a un aumento en la relación de corrientes AMPA/NMDA, indicando un aumento en la fuerza sináptica en neuronas de NAc Core. El tratamiento previo de 5 días con Ceftriaxona no fue suficiente para normalizar la fuerza sináptica en neuronas de NAc Core.

DISCUSIÓN

El presente estudio aporta la primera evidencia del impacto a largo plazo que un estrés agudo ejerce sobre el efecto de cocaína en la neurotransmisión glutamatérgica de neuronas presinápticas y postsinápticas en NAc Core (pero no Shell), la interacción con el sistema dopaminérgico en Core, y como estas adaptaciones contribuyen al aumento de la saliencia motivacional en la sensibilización conductual a cocaína. Entre las adaptaciones observadas en NAc Core podemos enumerar cambios en la presinapsis dopaminérgica, en la homeostasis y liberación de glutamato, y en la expresión de superficie del receptor glutamatérgico AMPA en las neuronas postsinápticas de NAc y la relación con la liberación de DA. Además, se demuestra en este trabajo que el estrés agudo induce cambios permanentes en la farmacología y la fisiología del NAc Core que potencian los efectos estimulantes de cocaína aguda, y contribuirían a la vulnerabilidad a la adicción a droga. De manera interesante, las adaptaciones observadas por estrés agudo recapitulan los efectos conductuales y neuroquímicos producidos por la exposición diaria de cocaína y son indicativos del proceso de sensibilización a la droga. La evidencia de la influencia proactiva del estrés sobre el efecto estimulante motor de cocaína, observado tres semanas después de una sola sesión de estrés por inmovilización, hace recordar a los mecanismos neurales implicados en el tratamiento repetido de la droga, y lleva a pensar en la intercambiabilidad de mecanismos por el tratamiento repetido de cocaína o por estrés y la sensibilización cruzada entre ambos.

Los principales hallazgos observados de forma diferencial en el NAc Core *vs* Shell demostraron que: 1) Tres semanas después de la exposición a un estrés agudo (inmovilización de 2 h), la administración de una dosis aguda de cocaína puso en evidencia el fenómeno de sensibilización cruzada a los efectos estimulantes motores de cocaína de forma dosis-dependiente así como un aumento de la liberación de DA en NAc Core, y no en Shell, en respuesta a la droga. 2) La expresión de la sensibilización conductual y el aumento de la liberación de DA en el NAc Core luego de una dosis aguda de cocaína en animales que fueron expuestos a estrés por inmovilización tres semanas antes, se asociaron con cambios en la expresión de la subunidad GluR1 del receptor AMPA de NAc, preferentemente Core. Así, se encontró un aumento en la expresión de superficie de GluR1 que representa el 90% de los receptores AMPA de NAc en animales previamente expuestos a una sola sesión de estrés, sin observarse cambios por la inyección aguda de cocaína o vehículo. Consistentemente, cuando estos animales fueron microinyectados con una dosis de agonista AMPA en Core, pero no en Shell, se observó la expresión de sensibilización conductual locomotora, fenómeno que fue bloqueado cuando fueron microinyectados con el antagonista de los receptores AMPA

(CNQX) en Core, previo a la dosis aguda de cocaína. Por último, se demostró la participación de los receptores AMPA en la liberación de DA en Core debido a que la perfusión de CNQX bloqueó el mayor aumento en la liberación de DA observada luego de la inyección aguda de cocaína. Es interesante destacar que la utilización del antagonista CNQX bloqueó o revirtió el fenómeno de sensibilización conductual y neuroquímico dopaminérgico, pero en ninguno de los casos interfirió en el efecto agudo de la droga. 3) La exposición a estrés agudo de inmovilización evidenció una robusta alteración en la homeostasis glutamatérgica en NAc Core. Concretamente, se encontró un aumento en los niveles basales de Glu extracelular en Core, pero no en Shell, en correspondencia con una disminuida expresión del transportador glutamatérgico GLT-1. Cuando los animales fueron sometidos a una inyección aguda de cocaína tres semanas después del estrés, se evidenció una menor liberación de Glu respecto del control. Más relevante aún, es el hecho que esta alteración de la homeostasis subyace a la expresión de la sensibilización conductual, debido a que cuando los animales fueron tratados crónicamente con Ceftriaxona durante 5 días (induce un aumento de los niveles de GLT-1, Rasmussen y col., 2011), la expresión de este fenómeno fue revertida así como los cambios en los parámetros bioquímicos asociados que miden en parte la actividad glutamatérgica pre-sináptica (captación de Glutamato- H^3 y desborde (*spillover*) de Glu). Aunque de manera interesante, la relación de corrientes AMPA/NMDA registrada en NAc Core tres semanas después del estrés agudo, no fue restablecida a los valores controles luego del tratamiento de 5 días con Ceftriaxona.

En resumen, la respuesta conductual sensibilizada a cocaína observada en animales expuestos a una sola sesión de estrés por inmovilización tres semanas antes, se debe a las neuroadaptaciones tales como la desregulación de la homeostasis glutamatérgica, reflejada en cambios en los niveles basales y de liberación sináptica de Glu, que impactan sobre neuronas postsinápticas de NAc de forma diferencial en Core respecto de Shell y en la expresión del receptor AMPA. Además, la participación del receptor AMPA en la transmisión y liberación de DA en NAc Core pero no en Shell. La evidencia causal de estas afirmaciones se debe a que cuando la homeostasis fue restablecida o los receptores AMPA fueron bloqueados, no se observó la expresión de la sensibilización conductual, inducida por estrés a los efectos estimulantes de cocaína.

Una sola sesión de estrés por inmovilización induce sensibilización a los efectos estimulantes motores y en la liberación de DA luego de cocaína en Core, pero no en Shell.

Los experimentos presentados demuestran que una sola sesión de estrés por inmovilización, es capaz de inducir cambios plásticos a nivel de la neuronas mesocorticolímbicas dopaminérgicas que se ponen en evidencia luego de una dosis aguda de cocaína. Específicamente, durante el estrés se induce un aumento de la saliencia motivacional que de acuerdo con Pierce y Kalivas (1997) se desarrolla inicialmente en ATV y luego, frente a una dosis desafío de droga se observa la expresión de la sensibilización motora a los efectos estimulantes de cocaína mediados principalmente por el NAc (Pierce y Kalivas, 1997). Es interesante remarcar que los efectos estimulantes motores de cocaína fueron dosis-dependiente para ambos grupos de animales, controles y estresados, siendo evidente el efecto del aumento de la saliencia motivacional en la conducta locomotora a la dosis de 15 mg/kg. Por otro lado, la mayoría de los experimentos neuroquímicos se realizaron diferenciando la respuesta obtenida en las subestructuras del NAc, siendo las alteraciones permanentes inducidas por estrés agudo manifestadas en mayor medida en Core, y no en Shell, a lo largo de los experimentos. El aumento del efecto de psicoestimulantes, inducido por exposición previa a estresores como restricción de comida (Campbell y Fibiger, 1971; Rouge-Pont y col., 1995), estrés por inmovilización (Deroche y col., 1992; 1995; Camp y Robinson, 1988); *shock* eléctrico en la patas (Kalivas y Stewart, 1991) o pinchazo en la cola (Antelman y col., 1980; Rouge-Pont y col., 1993); o por el tratamiento repetido de psicoestimulantes (Robinson y col., 1988; Wolf y Jeziorski, 1993; Paulson y Robinson, 1995), ha sido observado en su mayoría sobre la actividad motora y también en los niveles de DA en el NAc por incrementar la actividad de neuronas mesocorticolímbicas dopaminérgicas (Robinson y Becker, 1986; Kalivas y Stewart, 1991).

El rol preponderante de NAc Core sobre el Shell en los cambios duraderos neuroquímicos que contribuyen a la sensibilización conductual, son consistentes con una parte importante de la literatura. Resultados previos de nuestro laboratorio evidenciaron un aumento de la liberación de DA en respuesta a una dosis subumbral de amfetamina que se observó en ambas subestructuras del NAc, 24 hs después de la sesión de estrés por inmovilización. Sin embargo, ocho días después de la sesión de estrés el aumento en la liberación de DA solo se evidenció en el Core del NAc y no en Shell (Pacchioni y col., 2007).

Además, la sensibilización a morfina, anfetamina o cocaína produjo un aumento en la liberación de DA en el Core, pero no así en el Shell, luego una inyección aguda de la droga a los 10-15 días de abstinencia (Cadoni y Di Chiara, 1999; Cadoni y col., 2000). Más aún, en un modelo de estrés por restricción de comida diaria se observó sensibilización a los efectos reforzantes de psicoestimulantes y estos cambios se encontraron asociados con un aumento en la respuesta de liberación de DA en Core respecto de Shell (Cadoni y col., 2003). Sin embargo, cuando anfetamina fue microinyectada directamente en el Shell, se produjo un mayor aumento local en la liberación de DA luego de cocaína crónica en un período de abstinencia corta, mientras que luego de un período más largo de abstinencia no hubo diferencia en la liberación de DA, como resultado de la microinyección de anfetamina, en animales tratados con salina o cocaína crónica (Pierce y Kalivas, 1995). En relación a esto, Chen y col. (1996) demostraron que la inyección aguda de cocaína aumenta la liberación de DA en el NAc, luego de 7 días de abstinencia de tratamiento crónico con cocaína comparado con los controles, pero este aumento ocurre solo en respuesta a una inyección sistémica de cocaína y no cuando esta fue perfundida por diálisis reversa en el NAc. En otro experimento donde se diferenciaron las muestras tomadas de NAc Core respecto de NAc Shell durante la etapa de adquisición de la autoadministración, un mayor aumento en la liberación de DA fue observado en Shell que en Core (Lecca y col., 2007; Suto y col., 2010). No obstante, el mismo autor Lecca y col. (2007) demostró que después de tres semanas de disponibilidad diaria de droga, la exposición pasiva a cocaína resultó en una progresiva pérdida de la respuesta preferencial de Shell en la liberación de DA y un aumento preferencial de la respuesta en Core. De esta manera, la influencia facilitadora del estrés en el aumento inducido por cocaína en la liberación de DA en el Core es consistente con la idea de considerar a Core un sustrato neural de la expresión a largo plazo de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés o drogas, lo cual le asignaría a esta estructura un rol relevante en la ejecución a largo plazo de las conductas relacionadas con la adicción (Di Chiara, 2002; Ito y col., 2004; Meredith y col., 2008). Interesantemente, claves asociadas con la administración repetida de cocaína presentadas de forma no contingente también aumentan la liberación de DA en Core, pero no en Shell (Ito y col., 2000). Debido a que los mecanismos dopaminérgicos en Core o Shell también contribuyen diferencialmente a las conductas reforzantes (Ito y col., 2000; 2004; Ambroggi y col., 2008; Nicola, 2010), más estudios deberían ser realizados para determinar la relevancia de la contribución diferencial del estrés

en los cambios inducidos por cocaína en la liberación de DA en Core respecto de Shell a los efectos reforzantes.

La hipótesis de un mecanismo común entre estrés y drogas para influir la actividad de la vía dopaminérgica mesolímbica guarda relación con estudios que demostraron que adaptaciones en la neurotransmisión excitatoria en ATV conducen a la sensibilización cruzada entre droga y estrés. Por ejemplo, el estudio de Saal y col., (2003) y Campioni y col., (2009) evidenciaron que la administración aguda de drogas como anfetamina, cocaína, alcohol, nicotina o morfina o estrés por nado forzado en agua fría aumentan la relación de las corrientes AMPA y NMDA registradas en ATV, indicando un aumento en la transmisión sináptica excitatoria de las neuronas dopaminérgicas, identificando como un mecanismo dependiente de glucocorticoides. Otros estudios de electrofisiología demostraron que CRF regula la excitabilidad de neuronas dopaminérgicas de ATV (Korotkova y col., 2006; Wanat y col., 2008) y las eferentes glutamatérgicas sinápticas de estas neuronas (Ungless y col., 2003). Numerosas líneas de investigación han demostrado el rol crítico de CRF en la acción sobre el sistema dopaminérgico en conductas relacionadas con el estrés. Interesantemente, se comprobó que la interacción de CRF con Glu en el ATV no solo regula la iniciación de la adicción relacionada con la conducta, sino también juega un rol en la expresión de esta conducta (Wang y col., 2005, 2007). Ha sido demostrado que los antagonistas de CRF inhiben la recaída por estrés en la búsqueda de cocaína (Wang y col., 2005, 2007), como así también inhiben la sensibilización cruzada a psicoestimulantes (Cole y col., 1990; Boyson y col., 2011). Resumiendo, estas evidencias nos permiten sugerir que CRF y corticosterona son mecanismos potenciales en la activación de neuronas dopaminérgicas mesolímbicas inducida por estrés, y facilitan los efectos estimulantes motores de psicoestimulantes, específicamente de cocaína en el modelo de sensibilización cruzada a cocaína inducido por estrés.

Implicancia de los receptores AMPA en la sensibilización a cocaína inducida por una sola sesión de estrés por inmovilización.

Los estudios presentados demuestran cuatro claras evidencias funcionales y cuantitativas que soportan la hipótesis de la implicancia de la transmisión glutamatérgica en la expresión de la sensibilización, específicamente el rol de los receptores AMPA en la expresión de la sensibilización locomotora y en respuesta a la liberación de DA luego de una inyección aguda de cocaína en animales que fueron expuestos tres semanas antes a una sesión de estrés por inmovilización.

La primera evidencia, es que la expresión de la sensibilización locomotora y dopaminérgica a cocaína inducida por estrés, fue prevenida por el pre-tratamiento con CNQX microinyectado o perfundido en el *buffer* de diálisis en el NAc Core. En este contexto, la inyección del antagonista del receptor AMPA de forma sistémica (GYKI 52466 o NBQX), (Karler y col., 1991; Tzschentke y Schmidt, 1997; Jackson y col., 1998; Mead y Stephens, 1998; Karler y col., 1994; Li y col., 1997) o microinyectado (CNQX, Pierce y col., 1996; Bell y col., 2000) en NAc Core, previo a la inyección aguda de la droga, revirtió la expresión de la sensibilización conductual a cocaína o anfetamina en animales que fueron previamente sensibilizados a la droga. El efecto inhibitorio de CNQX intra-Core en la expresión de la sensibilización dopaminérgica a cocaína luego del estrés, podría resultar de afectar la vía polisináptica de NAc a VTA, y llevar a cabo cambios en las terminales dopaminérgicas en el NAc Core. En apoyo a esta hipótesis, Choi y col. (2005) demostró que bloqueando los receptores AMPA de NAc, en coincidencia con la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2/3 se disminuye la actividad neuronal de VTA. Previamente, el mismo grupo (Choi y col., 2000) había demostrado que el bloqueo de los receptores AMPA, por la administración de CNQX intra-NAc, potenció la disminución de la actividad exploratoria inducida por el agregado de agonista de los receptores dopaminérgicos D2/3, sin observarse efecto luego de ser administrado solo.

La segunda evidencia, demuestra el rol de fuentes glutamatérgicas en la expresión de la sensibilización cruzada entre cocaína y estrés, en las acciones estimulantes locomotoras del agonista AMPA microinyectado en NAc Core, en animales previamente estresados, lo cual no fue observado cuando el agonista AMPA fue microinyectado en Shell. Una respuesta conductual similar fue observada luego de 2-3 semanas después de abstinencia, en animales sensibilizados por el tratamiento repetido de cocaína o anfetamina por otros grupos (Bell y Kalivas, 1996; Pierce y col., 1996; Suto y col., 2004).

La tercera evidencia, se refiere al aumento duradero observado en la expresión de superficie de la subunidad GluR1 del receptor AMPA en NAc de animales que fueron previamente estresados, sin notarse diferencia por la inyección aguda de la droga. Considerando que la mayor proporción del NAc corresponde al Core y debido a la selectividad de esta subestructura en los efectos del estrés, es probable que este aumento observado en GluR1 también se deba a cambios inducidos en Core más que en Shell, posibilidad que es sostenida además por el hecho que GluR1 en Shell inhibe más que promueve la expresión de la sensibilización a cocaína (Bachtell y col., 2008). En relación con

los resultados obtenidos, el aumento de GluR1 observado es consistente con el aumento sostenido en la inserción de la membrana del receptor AMPA en animales luego de 7, 14 o 21 días de abstinencia a cocaína crónica (Boudreau y Wolf, 2005; Ghasemzadeh y col., 2009; Schumann y Yaka, 2009). Sin embargo, estos cambios no fueron observados cuando el período libre de droga fue de 24 hs después de la última inyección (Boudreau y Wolf, 2005; Schumann y Yaka, 2009). De manera interesante, otras líneas de investigación proponen una interrelación más compleja entre el período libre de droga y la expresión de la sensibilización conductual. En este sentido, Ferrario y col (2010) demostraron una disminución en la expresión de receptores AMPA en el NAc, luego de una inyección aguda de cocaína, en animales que estuvieron 14 días de abstinencia y que habían recibido cocaína crónica. Aunque la disminución de GluR1 en NAc no se asoció con una disminución en la expresión de la sensibilización a los efectos estimulantes motores de cocaína, cuando CNQX fue microinyectado en NAc Core previo a la inyección aguda de cocaína, se observó una tendencia hacia una disminución en la actividad motora en este grupo de animales. La participación de los receptores AMPA en la expresión de la sensibilización conductual si bien es discutida por diferentes autores (Ferrario y col., 2010; Bachtell y Self, 2008; Bachtell y col., 2008), todos consideran que el proceso de sensibilización no puede ocurrir en ausencia de la transmisión del tono de los receptores AMPA

La cuarta evidencia, se relaciona a los cambios celulares inducidos a las tres semanas siguientes de la exposición a una sesión de estrés por inmovilización. Se observó un marcado aumento en la relación de los picos de las corrientes AMPA y NMDA, medida que confiere una idea de la fuerza sináptica en las MSN en el NAc Core. Estos resultados demostraron un aumento de la plasticidad sináptica en Core de animales previamente estresados, efecto que no fue revertido luego del tratamiento repetido con Ceftriaxona (más discutido adelante). Estos resultados se encuentran en concordancia con lo observado por los autores Kourrich y col. (2007) y Moussawi y col. (2011), que demostraron que las sinapsis excitatorias en NAc de MSN son potenciadas luego de una prolongada abstinencia en animales que habían sido previamente sensibilizados con tratamiento repetido de cocaína. Sin embargo, y en parte como fue discutido previamente, 24 hs después de cocaína repetida se evidenció una disminución de la transmisión sináptica expresada como una disminución de la relación AMPA/NMDA en el NAc (Kourrich y col, 2007; Thomas y col, 2001, Dobi y col., 2011). Una posible interpretación de esta disminución, es un aumento en la subunidad GluNR2B que conforma a los receptores NMDA y que ha sido relacionado con el aumento en la generación

de sinapsis silenciosas (Huang y col., 2009; Wolf y Ferrario, 2010). Las sinapsis silenciosas son conexiones glutamatérgicas encontradas durante el desarrollo, así como después de la exposición a cocaína, y definidas por la presencia de respuestas mediadas por los receptores NMDA en ausencia de receptores AMPA estables (Lee y Dong, 2011). En efecto, estas sinapsis silenciosas excitatorias fueron encontradas en NAc Shell 24 a 48 h después de la exposición de cocaína crónica y se cree que permiten que las MSN recluten más receptores AMPA y aumente la transmisión sináptica (Huang y col., 2009). Aunque esto podría ser un mecanismo subyacente a los cambios rápidos y aumentos transitorios en la plasticidad sináptica que se observaron en el NAc Core durante la búsqueda de la cocaína inducida por claves (Gipson y col., 2013), no está claro si estas sinapsis silenciosas perduran en períodos de abstinencia prolongada o si también ocurren en el NAc Core, ya que solo ha sido examinado el Shell en una etapa temprana de abstinencia (Huang y col., 2009). La potenciación que ha sido observada en las sinapsis excitatorias en NAc de MSN luego de una prolongada abstinencia (Ortinski y col., 2012), ha demostrado ser consistente con el aumento en el diámetro de las cabezas de las espinas y densidad de las espinas de MSN de NAc luego de tres semanas de abstinencia a cocaína crónica diaria (Shen y col., 2009), o al aumento en la densidad postsináptica luego de un mes de abstinencia a la administración repetida de cocaína (Robinson y col., 2001).

Como fue ampliamente descripto por diferentes autores, las espinas dendríticas son muy plásticas (Nimchinsky, 2002) y los cambios en su morfología se correlacionan con alteraciones en la fuerza sináptica (De Roo y col., 2008; Dietz y col., 2012, Dumitriu y col., 2012, Kasai y col., 2010). En efecto, fue demostrado el aumento en el diámetro de la cabeza de la espina como así también el aumento de la relación de las corrientes AMPA/NMDA en NAc luego de 2 semanas de abstinencia al tratamiento repetido de cocaína (Gipson y col., 2013), y se hipotetiza que el aumento en el diámetro de las cabezas de las espinas resulta de un aumento en el ciclo de actina y tráfico de los receptores AMPA a la superficie de las células (Dietz y col., 2012, Shen y col., 2009) llevando a un aumento de la fuerza sináptica. Además, Gipson y col., 2013 demostraron que la presentación (2 semanas después de abstinencia) de las claves asociadas al consumo de cocaína, llevan a un aumento aún mayor y transiente del diámetro de las cabezas de las espinas y de la relación AMPA/NMDA, y estos cambios se correlacionan positivamente con la intensidad de la recaída durante los primeros de 5-15 min del comienzo del experimento de búsqueda de cocaína. Es interesante remarcar que nuestros hallazgos son consistentes con cambios observados en la densidad postsináptica

de neuronas del NAc luego de estrés crónico por inmovilización. Más aún, alteraciones en el citoesqueleto de actina fueron observadas paralelamente al aumento de la expresión de los receptores AMPA por estrés (Esparza y col., 2012). Además, apoyando la idea de que cambios en las espinas podrían constituir la base estructural de cambios plásticos, entre otros el aumento de los receptores AMPA, la previa exposición a estrés crónico llevó a un aumento en la densidad de espinas del tipo maduras, que se caracterizan por ser estables y formar sinapsis fuertes y de mayor tamaño (Harris y Kater, 1994), fenómeno que solo se observó en el NAc Core y no así en Shell (Esparza sin publicar). En apoyo a estas observaciones, estudios previos de diferentes laboratorios demostraron que la hormona corticosterona, principal glucocorticoide en roedores, en estructuras como hipocampo aumentaba la movilidad y expresión del receptor AMPA en la superficie de estas neuronas llevando a una facilitación de la transmisión glutamatérgica (Groc y col., 2008; Martin y col., 2009; Conboy y Sandi, 2010). Concretamente, se evidenció en cortes de tejido de hipocampo, que corticosterona potencia el aumento en la superficie sináptica de receptores AMPA que contienen la subunidad GluR2 por un estímulo que genera potenciación a largo plazo, revelando la influencia de corticosterona en el tráfico de los receptores AMPA (Groc y col., 2008). Más tarde, Conboy y Sandi, 2010 obtuvieron resultados similares en animales en condiciones estresantes en un experimento de memoria espacial del tanque de Morris en agua fría, donde se correlacionó el aumento de corticosterona en sangre, con un aumento de memoria, aprendizaje y de la subunidad GluR2 en la superficie de neuronas de hipocampo.

Teniendo en cuenta que existen evidencias que relacionan el aumento de la saliencia motivacional o sensibilización con la búsqueda y autoadministración de drogas (Vezina, 2004; De Vries y col., 1998; 2002), estos resultados sugieren que la exposición previa a estrés participaría en la capacidad de los receptores AMPA de NAc en reinstalar la conducta de búsqueda. Resulta tentador postular que el aumento de la fuerza sináptica en NAc de MSN, es un importante mediador de la recaída si nos basamos en las evidencias con cocaína crónica. Sin embargo, este fenómeno no se observa con todas las drogas, por ejemplo la abstinencia prolongada a heroína o morfina provoca una reducción opuesta en el diámetro de las cabezas de las espinas y en la relación AMPA/NMDA (Robinson y Kolb, 1999b; Shen y col., 2011). Por lo tanto, el aumento duradero o la disminución de la fuerza sináptica observada después de la retirada de las drogas adictivas no es una constante neuroadaptación entre las drogas adictivas y pueden, por lo tanto, mediar características diferentes de la vulnerabilidad en la recaída o la búsqueda de droga dependiendo del tipo de droga.

En resumen, las evidencias presentadas de los cambios plásticos a nivel de las neuronas postsinápticas de NAc principalmente Core demuestran la relevancia de la participación de los receptores AMPA en la expresión de la sensibilización cruzada a cocaína inducida por estrés agudo, aunque en la expresión de la sensibilización conductual no solo intervienen los cambios en la postsinapsis sino también los que ocurren en la presinapsis glutamatérgica.

Implicancia de la Homeostasis Glutamatérgica en la expresión de la sensibilización a cocaína inducida por una sola sesión de estrés por inmovilización.

Siguiendo con la misma línea de mecanismos comunes entre estrés y drogas a nivel mesolímbico, el estrés agudo induce cambios permanentes en la farmacología y la fisiología del NAc Core y potencia los efectos de cocaína. Se evidenció un marcado aumento en los niveles basales extracelulares de Glu en el NAc Core de animales que fueron previamente estresados, y en relación a estos resultados se investigó la expresión del superficie del principal transportador de glutamato GLT-1 en el NAc (preferentemente Core). Una marcada disminución de GLT-1 fue observada en la fracción de gliosoma (la mayor proporción de GLT-1 se encuentra en astrocitos) mientras que no se encontraron evidencias de cambios en la actividad del intercambiador Cis/Glu. Específicamente, la disminución en la expresión de GLT-1 por previa exposición a estrés se asocia con el aumento en los niveles basales extracelulares de Glu en el Core. De manera interesante, cuando se evaluó la liberación de Glu luego de una inyección aguda de cocaína en animales previamente estresados, se encontró una menor liberación de Glu respecto de los controles. Diferentes autores como Baker y col. (2002) mediante experimentos de microdiálisis o por modelos computacionales (Pendyam y col., 2009), demostraron que el Glu basal actúa en principal medida sobre los receptores metabotrópicos ubicados en la perisinápsis glutamatérgica. Concretamente, la eliminación los receptores metabotrópicos mGluR2/3 regula la liberación de Glu por potenciar los canales de K^+ presinápticos, y suprime los canales de Ca^{++} voltaje dependientes que tienen influencia directa sobre la liberación de neurotransmisores (Conn y Pin, 1997; Kew y Kemp, 2005; Ferraguti y Shigemoto, 2006). Por lo tanto, al encontrarse el tono inhibitorio de estos receptores aumentado (debido al aumento en los niveles basales de Glu), los animales que fueron previamente estresados frente a una dosis desafío de cocaína liberan en proporción menos Glu que los controles. Por otro lado, se ha demostrado que cambios en los niveles basales extracelulares de Glu contribuirían a la pérdida de plasticidad sináptica en

las MSN luego del tratamiento repetido de cocaína o heroína (Peters y col., 2009). En efecto, se ha demostrado que los niveles basales extracelulares de Glu en el NAc se encuentran disminuidos después de la abstinencia al tratamiento repetido de cocaína, dando por resultado una disminuida expresión de la subunidad catalítica (xCT) del intercambiador cisteína/glutamato (Xc-). La relativa escasez de Glu previene la activación del mGluR necesario para la expresión de la plasticidad a largo plazo (Moussawi y col., 2009). Sin embargo, ni la reducción de xCT ni la reducción de Glu basal extracelular fue encontrado en el NAc después de la abstinencia al tratamiento repetido de heroína (Shen y col., 2013), indicando que el efecto de cocaína no es central para la recaída en la adicción de todas las drogas de abuso. En contraste con xCT, el tratamiento repetido de las drogas de abuso estudiadas hasta ahora han inducido reducciones permanentes del transportador GLT-1 en el NAc, incluyendo cocaína, heroína y nicotina (Gipson y col., 2013; Knackstedt y col., 2010a; Shen y col., 2013). La reducción duradera en la recaptación de Glu en la vecindad de la sinapsis se prevé que aumenta el desborde de glutamato en las sinapsis durante períodos de alta actividad sináptica, como fue observado durante el evento de recaída. De hecho, la reinstalación de la conducta de búsqueda de heroína o cocaína se asocia con un aumento transitorio en el glutamato extracelular que ha sido impedido mediante la inhibición de la proyección glutamatérgica de CPF a NAc Core (LaLumiere y Kalivas, 2008; McFarland y col., 2003).

Implicancia del Restablecimiento de la Homeostasis Glutamatérgica en la Expresión de la Sensibilización Cruzada

En una breve recapitulación podemos decir que el estrés por inmovilización y el tratamiento repetido de cocaína, inducen similares cambios en la plasticidad en las MSN de NAc, con algunos detalles particulares según el estímulo (ver más adelante), los cuales se asocian con la expresión de la sensibilización a cocaína inducida por estrés o drogas. Los cambios plásticos se encuentran relacionadas con las alteraciones en la homeostasis del glutamato y son compatibles con la siguiente secuencia de eventos: 1) luego de tres semanas del estrés por inmovilización hemos encontrado aumentado los niveles basales de Glu, que resultan en una alta unión a los mGluR2/3, y con ello un tono inhibitorio aumentado. Por el contrario en un tratamiento repetido de cocaína o heroína crónica se han determinado reducidos niveles basales de Glu, que llevan a una baja unión por los mGluR2/3 y con ello un tono inhibitorio disminuido y aumento en la liberación sináptica de Glu; 2) en ambos

modelos de sensibilización, inducido por drogas o por estrés, luego de tres semanas se evidenció una disminución de la recaptación de Glu debido a la disminución en la actividad y/o expresión del transportador GLT-1 lo que induce desborde (*spillover*) de Glu desde la sinapsis; 3) la inyección aguda de cocaína o las claves asociadas al consumo de cocaína aumentan la actividad en las sinapsis glutamatérgicas, resultando en un desborde de Glu de la sinapsis, y estimulando los receptores que se encuentran en el espacio extrasináptico como los receptores NMDA que contienen la subunidad GluNR2B, y los que se encuentran en el espacio sináptico como los receptores AMPA; 4) se ha demostrado además, que la activación de GluNR2B y mGluR5 (Cosgrove y col., 2011) señalizan un rápido incremento en el diámetro de las cabezas de las espinas y aumento de la relación AMPA/NMDA, que llevaría a una mayor fuerza en la transmisión sináptica. (Gipson y col., 2013).

La asociación de la alteración de la homeostasis del glutamato con la expresión de la sensibilización cruzada a cocaína inducida por estrés, es consistente con la establecida con la reinstalación en la conducta de búsqueda de drogas (Gipson y col., 2013; Knackstedt y col., 2010). De esta manera, la reparación de los niveles de glutamato a través de diversos fármacos que se dirigen a proteínas desreguladas en la sinapsis tripartita (presinapsis, postsinapsis y glía) ha sido de especial interés. De estas terapias farmacológicas conocidas una es la familia de antibióticos β -lactámicos, como Ceftriaxona, y la otra es el antioxidante N-Acetil-Cisteína, ambas son efectivas en restaurar los niveles de GLT-1 y de Glu extracelular en el NAc de animales que recibieron tratamiento repetido de cocaína, nicotina o heroína (Knackstedt y col., 2010a; Moussawi y col., 2011; Shen y col., 2013). De la familia de antibióticos se ha demostrado que Ceftriaxona es el que tiene mayor potencia en aumentar la expresión y función de GLT-1 “*in vivo e in vitro*” (Rothstein y col., 2005). El aumento de los niveles de GLT-1 es atribuible a un aumento en la transcripción de genes a través de la cascada de señalización del factor nuclear NF κ B (Lee y col., 2008). En nuestro modelo experimental cuando los animales recibían por 5 días un tratamiento diario con una dosis de 200 mg/kg de Ceftriaxona (Rasmussen y col., 2011) a partir del día 16 y hasta el día 20 después del estrés, el fenómeno de sensibilización a los efectos estimulantes motores de cocaína no se observó. Las pruebas bioquímicas (captación de Glutamato H³) y de electrofisiología (decaimiento de las corrientes NMDA) evidenciaron que el tratamiento con Ceftriaxona, fue efectivo para revertir los cambios inducidos por estrés, como resultado de la alteración de la homeostasis de glutamato sináptico y extrasináptico. Específicamente, Ceftriaxona revirtió la disminución en la captación de glutamato medida por el transportador

GLT-1 así como la potenciación del decaimiento de las corrientes NMDA (efecto desborde (*spillover*) de Glu en el espacio sináptico), inducidos ambos por la exposición a estrés. Sin embargo, Ceftriaxona no logró revertir el aumento de la relación de corrientes AMPA/NMDA, lo cual podría indicar que 5 días de tratamiento con Ceftriaxona parecen no ser suficientes para revertir los cambios en la fuerza sináptica originados por estrés. Esto podría relacionarse al hallazgo que son necesarios 12 días de tratamiento con N-Acetil-Cisteína una droga que también restablece la homeostasis glutamatérgica cambiada por cocaína, para lograr un completo restablecimiento de la relación de las corrientes AMPA/NMDA en un modelo de cocaína repetida (Moussawi y col., 2009). Resulta interesante remarcar entonces el rol de los cambios en la homeostasis glutamatérgica en la presinapsis en el Core del NAc en la expresión de la sensibilización cruzada a cocaína inducida por estrés agudo. Esta evidencia cobra aún más relevancia ya que ha sido demostrado que el restablecimiento de la homeostasis por la utilización de N-Acetil-Cisteína en humanos disminuyó el consumo de cigarrillos (Knackstedt y col., 2009), el uso de marihuana (Gray y col., 2010), los síntomas de compulsión y abstinencia a cocaína, por restablecer los niveles de Glu en individuos dependientes de cocaína (Amen y col., 2011; Schmaal y col., 2012). Se ha descrito que N-Acetil-Cisteína es prometedora no solo como tratamiento farmacológico, sino que en algunos casos, trastornos como el autismo, la esquizofrenia, la depresión, el trastorno bipolar, los juegos de azar, entre otros han sido mejorados aunque los resultados son preliminares y requieren de replicación (Berk y col., 2013).

Otras terapias en vez de dirigirse a proteínas gliales que participan en la homeostasis del glutamato, se dirigen a la acción directa sobre los receptores metabotrópicos presinápticos y postsinápticos y receptores ionotrópicos, que como ya se ha descrito han sido blanco en la expresión de la sensibilización cruzada y en modelos animales de recaída. Dado que el desbordamiento de glutamato (*spillover*) produciría una excesiva estimulación de los receptores de NMDA extrasinápticos que contienen GluNR2B, y de receptores metabotrópicos mGluR2/3 (cuya estimulación es inhibitoria del tono glutamatérgico), antagonistas y agonistas de estos receptores, respectivamente, han sido postulados para reducir la reinstalación o recaída a la conducta de búsqueda de cocaína inducido por claves o por droga, así como la recaída por nicotina (Kenny y col., 2003; Peters y Kalivas, 2006, Wang y col., 2013). Nosotros en este trabajo, demostramos que el antagonista de receptores AMPA suprime la sensibilización cruzada conductual y neuroquímica a cocaína, en

concordancia a lo observado por otros autores sobre el efecto bloqueante del antagonista en la expresión de la sensibilización a cocaína en un modelo de administración repetida de cocaína (Pierce y col., 1996). En conjunto estas últimas evidencias sugieren que el antagonista AMPA puede ser una herramienta farmacológica útil en poblaciones vulnerables a la adicción por exposición a situaciones de estrés. Cabe mencionar que en la reinstalación de la conducta de cocaína en un modelo de AA a la droga, el glutamato que ejerce rol crítico es el de la proyección glutamatérgica de la CPfr dorsal, y no de la ventral, a NAc. Esto último coincide con datos preliminares de nuestro laboratorio que asignan un lugar preponderante a esta vía en la expresión de la sensibilización cruzada a cocaína inducida por estrés (datos no mostrados) y apoya, una vez más, la hipótesis de sustratos comunes en el impacto que el estrés y las drogas ejercen en los circuitos de la adicción.

Cambios plásticos inducidos por estrés que subyacen a la sensibilización a cocaína

Considerable evidencia clínica ha demostrado que existe una correlación positiva entre experiencias estresantes de la vida y el abuso de drogas en humanos (Kosten y col., 1986; Dembo y col., 1989; Brown y col., 1995; Harrison y col., 1997; Jacobsen y col., 2001; Sinha, 2001). Esencialmente esta relación es soportada por experimentos conducidos en abusadores de alcohol o cocaína abstinentes (Adinoff y col., 2005a, b; Breese y col., 2005; Brady y col., 2006; Sinha y col., 2006; Fox y col., 2008). Además, se ha probado que la administración aguda de cortisol produce aumentos significativos en los informes de deseo en individuos adictos a la cocaína, lo que sugiere que el cortisol puede inducir un estado que está asociado con la búsqueda de drogas (Elman y col., 2003), y se ha evidenciado que animales se auto-administran oralmente corticosterona (Deroche y col., 1993). Más interesante aún es que animales que fueron adrenalectomizados o se encuentran bajo el tratamiento de inhibidores de corticosterona desarrollan una menor conducta de autoadministración de psicoestimulantes (Deroche y col., 1993; Piazza y col., 1994). Estudios preliminares de nuestro laboratorio demostraron que utilizando el mismo modelo que en este trabajo, se observa una facilitación del aprendizaje de autoadministración a cocaína respecto de los controles, tres semanas después de la exposición a una sola sesión de estrés por inmovilización. Se evidenció que el grupo de animales pre-estresados llegaban al criterio establecido (número de palanqueos en la palanca activa por día) entre 4-5 días antes que los controles en un período de nomás de 10 días de exposición y sin ningún tipo de entrenamiento previo (García-Keller, sin publicar). Estos resultados en conjunto con nuestros

estudios y el aporte de otros laboratorio demuestra que el estrés es capaz de inducir un aumento de los efectos reforzantes de psicoestimulantes (Piazza y col., 1990; Shaham y col., 1992) o morfina (del Rosario Capriles y Cancela, 2002). Los cambios neuroadaptativos que median la sensibilización a los efectos estimulantes de las drogas de abuso han sido postulados como mecanismos posibles que contribuyen al aumento del uso y abuso del consumo de droga (Robinson y Berridge, 1993, 2000; Vanderschuren y Kalivas, 2000), como facilitación del aprendizaje en la adquisición y mantenimiento de la conducta de autoadministración (Piazza y Le Moal, 1998) y la reincidencia a la búsqueda de droga por estresores (Robinson y Berridge, 1993, 2000).

En relación al esclarecimiento de los mecanismos moleculares, este estudio identifica mecanismos comunes entre estrés y drogas y la inducción de cambios permanentes en el cerebro producidos por estrés agudo por inmovilización evidenciados luego de la administración de cocaína. Notablemente, ciertas neuroadaptaciones perdurables en la transmisión y/o farmacología dopaminérgica y glutamatérgica observadas en el Core después de la abstinencia de cocaína diaria también se suscitan luego de una sola exposición a estrés (Pierce y col., 1996; McFarland y col., 2003). En particular, identificamos el rol de los receptores AMPA en el NAc (Cornish y Kalivas, 2000; Suto y col., 2004; Conrad y col., 2008; Famous y col., 2008), como así también la desregulación de la homeostasis glutamatérgica, reflejada en cambios en los niveles basales y de liberación sináptica de Glu, y el impacto de forma diferencial sobre las neuronas postsinápticas de NAc Core respecto de Shell, cambios que son similares a los observados en los modelos animales de recaída de cocaína (Backer y col., 2003; Kalivas, 2009; Knackstedt y col., 2009, 2010b; Gipson y col., 2013). Más relevante aún es que las terapias farmacológicas propuestas para el tratamiento de la adicción en diferentes drogas de abuso, entre ellas cocaína, en modelos animales (Knackstedt y col., 2010a; Rasmussen y col., 2011a, b; Sari y col., 2009) y en humanos (LaRowe y col., 2007), también podrían ser utilizados para disminuir la vulnerabilidad a desarrollar adicción inducida por eventos estresantes.

Como conclusión general, el presente estudio aporta las primeras evidencias que la historia previa a una sola sesión de estrés por inmovilización es capaz de inducir alteraciones en la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica que impactan sobre las MSN de NAc Core, atribuyéndole a esta área un rol clave en los efectos a largo plazo del estrés sobre las propiedades estimulantes de cocaína. Y como ha sido postulado que la sensibilización

inducida por drogas provoca una atribución excesiva de la saliencia motivacional (*incentive salience*) relacionada con la recompensa, y esto podría llevar a desencadenar patrones de compulsión y de búsqueda de droga en personas que desarrollaron adicción (Robinson y Berridge, 1993, 1995), los mecanismos y áreas estudiadas en esta tesis contribuirían al entendimiento de la transición del uso de drogas a la adicción observado en individuos vulnerables.

Este estudio demuestra que un estrés de la vida diaria puede producir facilitación de larga duración en los procesos que se encuentran fuertemente asociados a los modelos de adicción de cocaína crónica. Tomando todos los experimentos en conjunto, este estudio ayuda a entender, al menos en parte, los mecanismos que refuerzan la observación clínica de que el estrés de la vida puede ser un factor de vulnerabilidad en el desarrollo de la adicción a cocaína.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adinoff, B., S. R. Krebaum, P. A. Chandler, W. Ye, M. B. Brown and M. J. Williams (2005). "Dissection of hypothalamic-pituitary-adrenal axis pathology in 1-month-abstinent alcohol-dependent men, part 1: adrenocortical and pituitary glucocorticoid responsiveness." *Alcohol Clin Exp Res* 29(4): 517-527.
- Adinoff, B., S. R. Krebaum, P. A. Chandler, W. Ye, M. B. Brown and M. J. Williams (2005). "Dissection of hypothalamic-pituitary-adrenal axis pathology in 1-month-abstinent alcohol-dependent men, part 2: response to ovine corticotropin-releasing factor and naloxone." *Alcohol Clin Exp Res* 29(4): 528-537.
- Ambroggi, F., A. Ishikawa, H. L. Fields and S. M. Nicola (2008). "Basolateral amygdala neurons facilitate reward-seeking behavior by exciting nucleus accumbens neurons." *Neuron* 59(4): 648-661.
- Amen, S. L., L. B. Piacentine, M. E. Ahmad, S. J. Li, J. R. Mantsch, R. C. Risinger and D. A. Baker (2011). "Repeated N-acetyl cysteine reduces cocaine seeking in rodents and craving in cocaine-dependent humans." *Neuropsychopharmacology* 36(4): 871-878.
- Anagnostaras, S. G. and T. E. Robinson (1996). "Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning." *Behav Neurosci* 110(6): 1397-1414.
- Antelman, S. M., A. J. Eichler, C. A. Black and D. Kocan (1980). "Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization." *Science* 207(4428): 329-331.
- Aro, S. (1981). "Stress, morbidity, and health-related behaviour. A five-year follow-up study among metal industry employees." *Scand J Soc Med Suppl* 25: 1-130.
- Attwell, D. and P. Mobbs (1994). "Neurotransmitter transporters." *Curr Opin Neurobiol* 4(3): 353-359.
- Bachtell, R. K., K. H. Choi, D. L. Simmons, E. Falcon, L. M. Monteggia, R. L. Neve and D. W. Self (2008). "Role of GluR1 expression in nucleus accumbens neurons in cocaine sensitization and cocaine-seeking behavior." *Eur J Neurosci* 27(9): 2229-2240.
- Bachtell, R. K. and D. W. Self (2008). "Renewed cocaine exposure produces transient alterations in nucleus accumbens AMPA receptor-mediated behavior." *J Neurosci* 28(48): 12808-12814.
- Baker, D. A., K. McFarland, R. W. Lake, H. Shen, X. C. Tang, S. Toda and P. W. Kalivas (2003). "Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse." *Nat Neurosci* 6(7): 743-749.
- Baker, D. A., Z. X. Xi, H. Shen, C. J. Swanson and P. W. Kalivas (2002). "The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate." *J Neurosci* 22(20): 9134-9141.
- Barbour, B. (2001). "An evaluation of synapse independence." *J Neurosci* 21(20): 7969-7984.
- Beart, P. M. and R. D. O'Shea (2007). "Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement." *Br J Pharmacol* 150(1): 5-17.
- Bell, K., P. Duffy and P. W. Kalivas (2000). "Context-specific enhancement of glutamate transmission by cocaine." *Neuropsychopharmacology* 23(3): 335-344.
- Bell, K. and P. W. Kalivas (1996). "Context-specific cross-sensitization between systemic cocaine and intra-accumbens AMPA infusion in the rat." *Psychopharmacology (Berl)* 127(4): 377-383.
- Ben-Shahar, O., P. Keeley, M. Cook, W. Brake, M. Joyce, M. Nyffeler, R. Heston and A. Ettenberg (2007). "Changes in levels of D1, D2, or NMDA receptors during withdrawal from brief or extended daily access to IV cocaine." *Brain Res* 1131(1): 220-228.
- Berberich, S., P. Punnakkal, V. Jensen, V. Pawlak, P. H. Seeburg, O. Hvalby and G. Kohr (2005). "Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation." *J Neurosci* 25(29): 6907-6910.

- Bergles, D. E., J. S. Diamond and C. E. Jahr (1999). "Clearance of glutamate inside the synapse and beyond." *Curr Opin Neurobiol* 9(3): 293-298.
- Bergles, D. E., J. D. Roberts, P. Somogyi and C. E. Jahr (2000). "Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus." *Nature* 405(6783): 187-191.
- Berk, M., G. S. Malhi, L. J. Gray and O. M. Dean (2013). "The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry." *Trends Pharmacol Sci* 34(3): 167-177.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* 361(6407): 31-39.
- Bonhomme, N., M. Cador, L. Stinus, M. Le Moal and U. Spampinato (1995). "Short and long-term changes in dopamine and serotonin receptor binding sites in amphetamine-sensitized rats: a quantitative autoradiographic study." *Brain Res* 675(1-2): 215-223.
- Boudreau, A. C., C. R. Ferrario, M. J. Glucksman and M. E. Wolf (2009). "Signaling pathway adaptations and novel protein kinase A substrates related to behavioral sensitization to cocaine." *J Neurochem* 110(1): 363-377.
- Boudreau, A. C., J. M. Reimers, M. Milovanovic and M. E. Wolf (2007). "Cell surface AMPA receptors in the rat nucleus accumbens increase during cocaine withdrawal but internalize after cocaine challenge in association with altered activation of mitogen-activated protein kinases." *J Neurosci* 27(39): 10621-10635.
- Boudreau, A. C. and M. E. Wolf (2005). "Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens." *J Neurosci* 25(40): 9144-9151.
- Boyson, C. O., T. T. Miguel, I. M. Quadros, J. F. Debold and K. A. Miczek (2011). "Prevention of social stress-escalated cocaine self-administration by CRF-R1 antagonist in the rat VTA." *Psychopharmacology (Berl)* 218(1): 257-269.
- Brady, K. T. (1997). "Posttraumatic stress disorder and comorbidity: recognizing the many faces of PTSD." *J Clin Psychiatry* 58 Suppl 9: 12-15.
- Brady, K. T., S. E. Back, A. E. Waldrop, A. L. McRae, R. F. Anton, H. P. Upadhyaya, M. E. Saladin and P. K. Randall (2006). "Cold pressor task reactivity: predictors of alcohol use among alcohol-dependent individuals with and without comorbid posttraumatic stress disorder." *Alcohol Clin Exp Res* 30(6): 938-946.
- Brady, K. T., B. S. Dansky, S. E. Back, E. B. Foa and K. M. Carroll (2001). "Exposure therapy in the treatment of PTSD among cocaine-dependent individuals: preliminary findings." *J Subst Abuse Treat* 21(1): 47-54.
- Bredt, D. S. and R. A. Nicoll (2003). "AMPA receptor trafficking at excitatory synapses." *Neuron* 40(2): 361-379.
- Breese, G. R., K. Chu, C. V. Dayas, D. Funk, D. J. Knapp, G. F. Koob, D. A. Le, L. E. O'Dell, D. H. Overstreet, A. J. Roberts, R. Sinha, G. R. Valdez and F. Weiss (2005). "Stress enhancement of craving during sobriety: a risk for relapse." *Alcohol Clin Exp Res* 29(2): 185-195.
- Brigman, J. L., T. Wright, G. Talani, S. Prasad-Mulcare, S. Jinde, G. K. Seabold, P. Mathur, M. I. Davis, R. Bock, R. M. Gustin, R. J. Colbran, V. A. Alvarez, K. Nakazawa, E. Delpire, D. M. Lovinger and A. Holmes (2010). "Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs

- long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning." *J Neurosci* 30(13): 4590-4600.
- Brown, S. A., P. W. Vik, T. L. Patterson, I. Grant and M. A. Schuckit (1995). "Stress, vulnerability and adult alcohol relapse." *J Stud Alcohol* 56(5): 538-545.
- Cadoni, C. and G. Di Chiara (1999). "Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine." *Neuroscience* 90(2): 447-455.
- Cadoni, C., A. Pisanu, M. Solinas, E. Acquas and G. Di Chiara (2001). "Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine." *Psychopharmacology (Berl)* 158(3): 259-266.
- Cadoni, C., M. Solinas and G. Di Chiara (2000). "Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine." *Eur J Pharmacol* 388(1): 69-76.
- Cadoni, C., M. Solinas, V. Valentini and G. Di Chiara (2003). "Selective psychostimulant sensitization by food restriction: differential changes in accumbens shell and core dopamine." *Eur J Neurosci* 18(8): 2326-2334.
- Camp, D. M. and T. E. Robinson (1988). "Susceptibility to sensitization. II. The influence of gonadal hormones on enduring changes in brain monoamines and behavior produced by the repeated administration of D-amphetamine or restraint stress." *Behav Brain Res* 30(1): 69-88.
- Campbell, B. A. and H. C. Fibiger (1971). "Potentiation of amphetamine-induced arousal by starvation." *Nature* 233(5319): 424-425.
- Campioni, M. R., M. Xu and D. S. McGehee (2009). "Stress-induced changes in nucleus accumbens glutamate synaptic plasticity." *J Neurophysiol* 101(6): 3192-3198.
- Cancela, L. M., M. Volosin and V. A. Molina (1996). "Gangliosides attenuate stress-induced changes on body weight, motor activity and on the behavioral response to 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine." *Brain Res Bull* 40(2): 105-110.
- Capriles, N. and L. M. Cancela (1999). "Effect of acute and chronic stress restraint on amphetamine-associated place preference: involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors." *Eur J Pharmacol* 386(2-3): 127-134.
- Cartmell, J., K. W. Perry, C. R. Salhoff, J. A. Monn and D. D. Schoepp (2000). "The potent, selective mGlu2/3 receptor agonist LY379268 increases extracellular levels of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in the medial prefrontal cortex of the freely moving rat." *J Neurochem* 75(3): 1147-1154.
- Chefer, V. I., A. C. Thompson, A. Zapata and T. S. Shippenberg (2009). "Overview of brain microdialysis." *Curr Protoc Neurosci* Chapter 7: Unit7 1.
- Chen, C. Y. and J. C. Anthony (2004). "Epidemiological estimates of risk in the process of becoming dependent upon cocaine: cocaine hydrochloride powder versus crack cocaine." *Psychopharmacology (Berl)* 172(1): 78-86.
- Chen, J., R. Marmur, W. Paredes, A. Pulles and E. L. Gardner (1996). "Systemic cocaine challenge after chronic cocaine treatment reveals sensitization of extracellular dopamine levels in nucleus accumbens but

-
- direct cocaine perfusion into nucleus accumbens does not: implications for the neural locus of cocaine sensitization." *Life Sci* 58(8): PL139-146.
- Choi, K. H., R. L. Clements and A. J. Greenshaw (2005). "Simultaneous AMPA/kainate receptor blockade and dopamine D(2/3) receptor stimulation in the nucleus accumbens decreases brain stimulation reward in rats." *Behav Brain Res* 158(1): 79-88.
- Choi, K. H., B. Zarandi, K. G. Todd, A. M. Biondo and A. J. Greenshaw (2000). "Effects of AMPA/kainate receptor blockade on responses to dopamine receptor agonists in the core and shell of the rat nucleus accumbens." *Psychopharmacology (Berl)* 150(1): 102-111.
- Chu, K., S. T. Lee, D. I. Sinn, S. Y. Ko, E. H. Kim, J. M. Kim, S. J. Kim, D. K. Park, K. H. Jung, E. C. Song, S. K. Lee, M. Kim and J. K. Roh (2007). "Pharmacological Induction of Ischemic Tolerance by Glutamate Transporter-1 (EAAT2) Upregulation." *Stroke* 38(1): 177-182.
- Clark, D. B., K. G. Lynch, J. E. Donovan and G. D. Block (2001). "Health problems in adolescents with alcohol use disorders: self-report, liver injury, and physical examination findings and correlates." *Alcohol Clin Exp Res* 25(9): 1350-1359.
- Claye, L. H., H. C. Akunne, M. D. Davis, S. DeMattos and K. F. Soliman (1995). "Behavioral and neurochemical changes in the dopaminergic system after repeated cocaine administration." *Mol Neurobiol* 11(1-3): 55-66.
- Cole, B. J., M. Cador, L. Stinus, J. Rivier, W. Vale, G. F. Koob and M. Le Moal (1990). "Central administration of a CRF antagonist blocks the development of stress-induced behavioral sensitization." *Brain Res* 512(2): 343-346.
- Collingridge, G. L. and R. A. Lester (1989). "Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system." *Pharmacol Rev* 41(2): 143-210.
- Collingridge, G. L., R. W. Olsen, J. Peters and M. Spedding (2009). "A nomenclature for ligand-gated ion channels." *Neuropharmacology* 56(1): 2-5.
- Conboy, L. and C. Sandi (2010). "Stress at learning facilitates memory formation by regulating AMPA receptor trafficking through a glucocorticoid action." *Neuropsychopharmacology* 35(3): 674-685.
- Conn, P. J. and J. P. Pin (1997). "Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-237.
- Conrad, K. L., K. Y. Tseng, J. L. Uejima, J. M. Reimers, L. J. Heng, Y. Shaham, M. Marinelli and M. E. Wolf (2008). "Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving." *Nature* 454(7200): 118-121.
- Conway, K. P., J. D. Swendsen, B. J. Rounsaville and K. R. Merikangas (2002). "Personality, drug of choice, and comorbid psychopathology among substance abusers." *Drug Alcohol Depend* 65(3): 225-234.
- Cornish, J. L. and P. W. Kalivas (2000). "Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction." *J Neurosci* 20(15): RC89.
- Cosgrove, K. E., S. D. Meriney and G. Barrionuevo (2011). "High affinity group III mGluRs regulate mossy fiber input to CA3 interneurons." *Hippocampus* 21(12): 1302-1317.
- Crum, R. M., Y. F. Chan, L. S. Chen, C. L. Storr and J. C. Anthony (2005). "Incidence rates for alcohol dependence among adults: prospective data from the Baltimore Epidemiologic Catchment Area Follow-Up Survey, 1981-1996." *J Stud Alcohol* 66(6): 795-805.
-

-
- Cull-Candy, S., L. Kelly and M. Farrant (2006). "Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond." *Curr Opin Neurobiol* 16(3): 288-297.
- Cull-Candy, S. G. and D. N. Leszkiewicz (2004). "Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses." *Sci STKE* 2004(255): re16.
- Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." *Prog Neurobiol* 65(1): 1-105.
- De Roo, M., P. Klauser, P. M. Garcia, L. Poglia and D. Muller (2008). "Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes." *Prog Brain Res* 169: 199-207.
- De Vries, T. J., A. N. Schoffelmeer, R. Binnekade, A. H. Mulder and L. J. Vanderschuren (1998). "Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization." *Eur J Neurosci* 10(11): 3565-3571.
- De Vries, T. J., A. N. Schoffelmeer, R. Binnekade, H. Raaso and L. J. Vanderschuren (2002). "Relapse to cocaine- and heroin-seeking behavior mediated by dopamine D2 receptors is time-dependent and associated with behavioral sensitization." *Neuropsychopharmacology* 26(1): 18-26.
- del Rosario Capriles, N. and L. M. Cancela (2002). "Motivational effects mu- and kappa-opioid agonists following acute and chronic restraint stress: involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors." *Behav Brain Res* 132(2): 159-169.
- del Rosario, C. N., A. M. Pacchioni and L. M. Cancela (2002). "Influence of acute or repeated restraint stress on morphine-induced locomotion: involvement of dopamine, opioid and glutamate receptors." *Behav Brain Res* 134(1-2): 229-238.
- Dembo, R., L. Williams, E. Berry, A. Getreu, M. Washburn, E. D. Wish and J. Schmeidler (1988). "The relationship between physical and sexual abuse and illicit drug use: a replication among a new sample of youths entering a juvenile detention center." *Int J Addict* 23(11): 1101-1123.
- Dembo, R., L. Williams, L. La Voie, E. Berry, A. Getreu, E. D. Wish, J. Schmeidler and M. Washburn (1989). "Physical abuse, sexual victimization, and illicit drug use: replication of a structural analysis among a new sample of high-risk youths." *Violence Vict* 4(2): 121-138.
- Derkach, V. A., M. C. Oh, E. S. Guire and T. R. Soderling (2007). "Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci* 8(2): 101-113.
- Deroche, V., M. Marinelli, S. Maccari, M. Le Moal, H. Simon and P. V. Piazza (1995). "Stress-induced sensitization and glucocorticoids. I. Sensitization of dopamine-dependent locomotor effects of amphetamine and morphine depends on stress-induced corticosterone secretion." *J Neurosci* 15(11): 7181-7188.
- Deroche, V., P. V. Piazza, P. Casolini, S. Maccari, M. Le Moal and H. Simon (1992). "Stress-induced sensitization to amphetamine and morphine psychomotor effects depend on stress-induced corticosterone secretion." *Brain Res* 598(1-2): 343-348.
- DeVries, A. C., S. E. Taymans, J. M. Sundstrom and A. Pert (1998). "Conditioned release of corticosterone by contextual stimuli associated with cocaine is mediated by corticotropin-releasing factor." *Brain Res* 786(1-2): 39-46.
- Dewart, T., B. Frank and J. Schmeidler (2006). "The impact of 9/11 on patients in New York City's substance abuse treatment programs." *Am J Drug Alcohol Abuse* 32(4): 665-672.
-

-
- Di Chiara, G. (1998). "A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use." *J Psychopharmacol* 12(1): 54-67.
- Di Chiara, G. (2002). "Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction." *Behav Brain Res* 137(1-2): 75-114.
- Di Chiara, G. and A. Imperato (1988). "Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(14): 5274-5278.
- Di Chiara, G., G. Tanda, R. Frau and E. Carboni (1993). "On the preferential release of dopamine in the nucleus accumbens by amphetamine: further evidence obtained by vertically implanted concentric dialysis probes." *Psychopharmacology (Berl)* 112(2-3): 398-402.
- Diaz-Otanez, C. S., N. R. Capriles and L. M. Cancela (1997). "D1 and D2 dopamine and opiate receptors are involved in the restraint stress-induced sensitization to the psychostimulant effects of amphetamine." *Pharmacol Biochem Behav* 58(1): 9-14.
- Dietz, D. M., H. Sun, M. K. Lobo, M. E. Cahill, B. Chadwick, V. Gao, J. W. Koo, M. S. Mazei-Robison, C. Dias, I. Maze, D. Damez-Werno, K. C. Dietz, K. N. Scobie, D. Ferguson, D. Christoffel, Y. Ohnishi, G. E. Hodes, Y. Zheng, R. L. Neve, K. M. Hahn, S. J. Russo and E. J. Nestler (2012). "Rac1 is essential in cocaine-induced structural plasticity of nucleus accumbens neurons." *Nat Neurosci* 15(6): 891-896.
- Dobi, A., G. K. Seabold, C. H. Christensen, R. Bock and V. A. Alvarez (2011). "Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal." *J Neurosci* 31(5): 1895-1904.
- Donzanti, B. A. and B. K. Yamamoto (1988). "An improved and rapid HPLC-EC method for the isocratic separation of amino acid neurotransmitters from brain tissue and microdialysis perfusates." *Life Sci* 43(11): 913-922.
- Dougherty, G. G., Jr. and E. H. Ellinwood, Jr. (1981). "Amphetamine behavioral toxicity: rotational behavior after chronic intrastriatal infusion." *Biol Psychiatry* 16(5): 479-488.
- Dube, S. R., V. J. Felitti, M. Dong, D. P. Chapman, W. H. Giles and R. F. Anda (2003). "Childhood abuse, neglect, and household dysfunction and the risk of illicit drug use: the adverse childhood experiences study." *Pediatrics* 111(3): 564-572.
- Dumitriu, D., Q. Laplant, Y. S. Grossman, C. Dias, W. G. Janssen, S. J. Russo, J. H. Morrison and E. J. Nestler (2012). "Subregional, dendritic compartment, and spine subtype specificity in cocaine regulation of dendritic spines in the nucleus accumbens." *J Neurosci* 32(20): 6957-6966.
- Dunkley, P. R., P. E. Jarvie and P. J. Robinson (2008). "A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes." *Nat Protoc* 3(11): 1718-1728.
- Elman, I., S. E. Lukas, K. H. Karlsgodt, G. P. Gasic and H. C. Breiter (2003). "Acute cortisol administration triggers craving in individuals with cocaine dependence." *Psychopharmacol Bull* 37(3): 84-89.
- Esparza, M. A., F. Bollati, C. Garcia-Keller, M. B. Virgolini, L. M. Lopez, A. Brusco, H. W. Shen, P. W. Kalivas and L. M. Cancela (2012). "Stress-induced sensitization to cocaine: actin cytoskeleton remodeling within mesocorticolimbic nuclei." *Eur J Neurosci* 36(8): 3103-3117.
-

- Famous, K. R., V. Kumaresan, G. Sadri-Vakili, H. D. Schmidt, D. F. Mierke, J. H. Cha and R. C. Pierce (2008). "Phosphorylation-dependent trafficking of GluR2-containing AMPA receptors in the nucleus accumbens plays a critical role in the reinstatement of cocaine seeking." *J Neurosci* 28(43): 11061-11070.
- Ferraguti, F. and R. Shigemoto (2006). "Metabotropic glutamate receptors." *Cell Tissue Res* 326(2): 483-504.
- Ferrario, C. R., X. Li, X. Wang, J. M. Reimers, J. L. Uejima and M. E. Wolf (2010). "The role of glutamate receptor redistribution in locomotor sensitization to cocaine." *Neuropsychopharmacology* 35(3): 818-833.
- Fibiger, H. C., F. G. LePiane, A. Jakubovic and A. G. Phillips (1987). "The role of dopamine in intracranial self-stimulation of the ventral tegmental area." *J Neurosci* 7(12): 3888-3896.
- Fiorino, D. F. and A. G. Phillips (1999). "Facilitation of sexual behavior and enhanced dopamine efflux in the nucleus accumbens of male rats after D-amphetamine-induced behavioral sensitization." *J Neurosci* 19(1): 456-463.
- Fischer-Smith, K. D., A. C. Houston and G. V. Rebec (2012). "Differential effects of cocaine access and withdrawal on glutamate type 1 transporter expression in rat nucleus accumbens core and shell." *Neuroscience* 210: 333-339.
- Fitzgerald, L. W., J. Ortiz, A. G. Hamedani and E. J. Nestler (1996). "Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents." *J Neurosci* 16(1): 274-282.
- Fonnum, F. (1984). "Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain." *J Neurochem* 42(1): 1-11.
- Fothergill, K. E. and M. E. Ensminger (2006). "Childhood and adolescent antecedents of drug and alcohol problems: A longitudinal study." *Drug Alcohol Depend* 82(1): 61-76.
- Fox, H. C., K. I. Hong, K. Siedlarz and R. Sinha (2008). "Enhanced sensitivity to stress and drug/alcohol craving in abstinent cocaine-dependent individuals compared to social drinkers." *Neuropsychopharmacology* 33(4): 796-805.
- Francesconi, A. and R. M. Duvoisin (2000). "Opposing effects of protein kinase C and protein kinase A on metabotropic glutamate receptor signaling: selective desensitization of the inositol trisphosphate/Ca²⁺ pathway by phosphorylation of the receptor-G protein-coupling domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 6185-6190.
- Freund, T. F., J. F. Powell and A. D. Smith (1984). "Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines." *Neuroscience* 13(4): 1189-1215.
- Gelernter, J. and H. R. Kranzler (2009). "Genetics of alcohol dependence." *Hum Genet* 126(1): 91-99.
- Ghasemzadeh, M. B., P. Vasudevan, C. Mueller, C. Seubert and J. R. Mantsch (2009). "Region specific alterations in glutamate receptor expression and subcellular distribution following extinction of cocaine self-administration." *Brain Res*.
- Gipson, C. D., Y. M. Kupchik, H. Shen, K. J. Reissner, C. A. Thomas and P. W. Kalivas (2013). "Relapse induced by cues predicting cocaine depends on rapid, transient synaptic potentiation." *Neuron* 77(5): 867-872.
- Gipson, C. D., K. J. Reissner, Y. M. Kupchik, A. C. Smith, N. Stankeviciute, M. E. Hensley-Simon and P. W. Kalivas (2013). "Reinstatement of nicotine seeking is mediated by glutamatergic plasticity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(22): 9124-9129.

-
- Gjessing, L. R., P. Gjesdahl and O. Sjaastad (1972). "The free amino acids in human cerebrospinal fluid." *J Neurochem* 19(7): 1807-1808.
- Gorelova, N. and C. R. Yang (1997). "The course of neural projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens in the rat." *Neuroscience* 76(3): 689-706.
- Grant, B. F., F. S. Stinson, D. A. Dawson, S. P. Chou, M. C. Dufour, W. Compton, R. P. Pickering and K. Kaplan (2004). "Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions." *Arch Gen Psychiatry* 61(8): 807-816.
- Grant, B. F., F. S. Stinson and T. C. Harford (2001). "Age at onset of alcohol use and DSM-IV alcohol abuse and dependence: a 12-year follow-up." *J Subst Abuse* 13(4): 493-504.
- Gray, K. M., N. L. Watson, M. J. Carpenter and S. D. Larowe (2010). "N-acetylcysteine (NAC) in young marijuana users: an open-label pilot study." *Am J Addict* 19(2): 187-189.
- Greger, I. H. and J. A. Esteban (2007). "AMPA receptor biogenesis and trafficking." *Curr Opin Neurobiol* 17(3): 289-297.
- Griffith, O. W. (1999). "Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis." *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 922-935.
- Groc, L., D. Choquet and F. Chaouloff (2008). "The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation." *Nat Neurosci* 11(8): 868-870.
- Groenewegen, H. J., C. I. Wright and A. V. Beijer (1996). "The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system?" *Prog Brain Res* 107: 485-511.
- Groenewegen, H. J., C. I. Wright, A. V. Beijer and P. Voorn (1999). "Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs." *Ann N Y Acad Sci* 877: 49-63.
- Haddad, G. G. and C. Jiang (1993). "Mechanisms of anoxia-induced depolarization in brainstem neurons: in vitro current and voltage clamp studies in the adult rat." *Brain Res* 625(2): 261-268.
- Hamberger, A. and B. Nystrom (1984). "Extra- and intracellular amino acids in the hippocampus during development of hepatic encephalopathy." *Neurochem Res* 9(9): 1181-1192.
- Harris, K. M. and S. B. Kater (1994). "Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function." *Annu Rev Neurosci* 17: 341-371.
- Harrison, P. A., J. A. Fulkerson and T. J. Beebe (1997). "Multiple substance use among adolescent physical and sexual abuse victims." *Child Abuse Negl* 21(6): 529-539.
- Hasin, D. S., F. S. Stinson, E. Ogburn and B. F. Grant (2007). "Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV alcohol abuse and dependence in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions." *Arch Gen Psychiatry* 64(7): 830-842.
- Haydon, P. G. (2001). "GLIA: listening and talking to the synapse." *Nat Rev Neurosci* 2(3): 185-193.
- Headley, P. M. and S. Grillner (1990). "Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function." *Trends Pharmacol Sci* 11(5): 205-211.
- Heffner, T. G., J. A. Hartman and L. S. Seiden (1980). "A rapid method for the regional dissection of the rat brain." *Pharmacol Biochem Behav* 13(3): 453-456.
-

-
- Heimer, L., G. F. Alheid, J. S. de Olmos, H. J. Groenewegen, S. N. Haber, R. E. Harlan and D. S. Zahm (1997). "The accumbens: beyond the core-shell dichotomy." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9(3): 354-381.
- Heimer, L., D. S. Zahm, L. Churchill, P. W. Kalivas and C. Wohltmann (1991). "Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat." *Neuroscience* 41(1): 89-125.
- Honig, L. S., D. D. Chambliss, E. H. Bigio, S. L. Carroll and J. L. Elliott (2000). "Glutamate transporter EAAT2 splice variants occur not only in ALS, but also in AD and controls." *Neurology* 55(8): 1082-1088.
- Hosli, E. and L. Hosli (1993). "Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system." *Prog Neurobiol* 40(4): 477-506.
- Hu, X. T. and F. J. White (1996). "Glutamate receptor regulation of rat nucleus accumbens neurons in vivo." *Synapse* 23(3): 208-218.
- Huang, Y. H., Y. Lin, P. Mu, B. R. Lee, T. E. Brown, G. Wayman, H. Marie, W. Liu, Z. Yan, B. A. Sorg, O. M. Schluter, R. S. Zukin and Y. Dong (2009). "In vivo cocaine experience generates silent synapses." *Neuron* 63(1): 40-47.
- Isaac, J. T., M. C. Ashby and C. J. McBain (2007). "The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity." *Neuron* 54(6): 859-871.
- Ito, R., J. W. Dalley, S. R. Howes, T. W. Robbins and B. J. Everitt (2000). "Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats." *J Neurosci* 20(19): 7489-7495.
- Ito, R., T. W. Robbins and B. J. Everitt (2004). "Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell." *Nat Neurosci* 7(4): 389-397.
- Jackson, A., A. N. Mead, B. A. Rocha and D. N. Stephens (1998). "AMPA receptors and motivation for drug: effect of the selective antagonist NBQX on behavioural sensitization and on self-administration in mice." *Behav Pharmacol* 9(5-6): 457-467.
- Jacobsen, L. K., S. M. Southwick and T. R. Kosten (2001). "Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of the literature." *Am J Psychiatry* 158(8): 1184-1190.
- Johnson, S. W. and R. A. North (1992). "Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons." *J Neurosci* 12(2): 483-488.
- Justinova, Z., S. R. Goldberg, S. J. Heishman and G. Tanda (2005). "Self-administration of cannabinoids by experimental animals and human marijuana smokers." *Pharmacol Biochem Behav* 81(2): 285-299.
- Kalivas, P. W. (1995). "Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants." *Drug Alcohol Depend* 37(2): 95-100.
- Kalivas, P. W. (2004). "Recent understanding in the mechanisms of addiction." *Curr Psychiatry Rep* 6(5): 347-351.
- Kalivas, P. W. (2009). "The glutamate homeostasis hypothesis of addiction." *Nat Rev Neurosci* 10(8): 561-572.
- Kalivas, P. W. and J. E. Alesdatter (1993). "Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor stimulation in the ventral tegmental area and amygdala in behavioral sensitization to cocaine." *J Pharmacol Exp Ther* 267(1): 486-495.
-

-
- Kalivas, P. W. and P. Duffy (1995). "D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area." *J Neurosci* 15(7 Pt 2): 5379-5388.
- Kalivas, P. W. and J. Stewart (1991). "Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity." *Brain Res Brain Res Rev* 16(3): 223-244.
- Kanai, Y. and M. A. Hediger (2004). "The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects." *Pflugers Arch* 447(5): 469-479.
- Kandel, D. B., J. G. Johnson, H. R. Bird, G. Canino, S. H. Goodman, B. B. Lahey, D. A. Regier and M. Schwab-Stone (1997). "Psychiatric disorders associated with substance use among children and adolescents: findings from the Methods for the Epidemiology of Child and Adolescent Mental Disorders (MECA) Study." *J Abnorm Child Psychol* 25(2): 121-132.
- Karler, R., L. D. Calder and J. B. Bedingfield (1994). "Cocaine behavioral sensitization and the excitatory amino acids." *Psychopharmacology (Berl)* 115(3): 305-310.
- Karler, R., L. D. Calder, I. A. Chaudhry and S. A. Turkanis (1989). "Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801." *Life Sci* 45(7): 599-606.
- Karler, R., L. D. Calder and S. A. Turkanis (1991). "DNQX blockade of amphetamine behavioral sensitization." *Brain Res* 552(2): 295-300.
- Karler, R., I. A. Chaudhry, L. D. Calder and S. A. Turkanis (1990). "Amphetamine behavioral sensitization and the excitatory amino acids." *Brain Res* 537(1-2): 76-82.
- Kasai, H., M. Fukuda, S. Watanabe, A. Hayashi-Takagi and J. Noguchi (2010). "Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition." *Trends Neurosci* 33(3): 121-129.
- Kauer, J. A. and R. C. Malenka (2007). "Synaptic plasticity and addiction." *Nat Rev Neurosci* 8(11): 844-858.
- Kenny, P. J., N. E. Paterson, B. Boutrel, S. Semenova, A. A. Harrison, F. Gasparini, G. F. Koob, P. D. Skoubis and A. Markou (2003). "Metabotropic glutamate 5 receptor antagonist MPEP decreased nicotine and cocaine self-administration but not nicotine and cocaine-induced facilitation of brain reward function in rats." *Ann N Y Acad Sci* 1003: 415-418.
- Kessler, R. C., P. Berglund, O. Demler, R. Jin, K. R. Merikangas and E. E. Walters (2005). "Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication." *Arch Gen Psychiatry* 62(6): 593-602.
- Kessler, R. C., W. T. Chiu, O. Demler, K. R. Merikangas and E. E. Walters (2005). "Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication." *Arch Gen Psychiatry* 62(6): 617-627.
- Kessler, R. C., R. M. Crum, L. A. Warner, C. B. Nelson, J. Schulenberg and J. C. Anthony (1997). "Lifetime co-occurrence of DSM-III-R alcohol abuse and dependence with other psychiatric disorders in the National Comorbidity Survey." *Arch Gen Psychiatry* 54(4): 313-321.
- Kew, J. N. and J. A. Kemp (2005). "Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology." *Psychopharmacology (Berl)* 179(1): 4-29.
- Kim, J. A., K. A. Pollak, G. O. Hjelmstad and H. L. Fields (2004). "A single cocaine exposure enhances both opioid reward and aversion through a ventral tegmental area-dependent mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(15): 5664-5669.
-

-
- Knackstedt, L. A. and P. W. Kalivas (2009). "Glutamate and reinstatement." *Curr Opin Pharmacol* 9(1): 59-64.
- Knackstedt, L. A., R. I. Melendez and P. W. Kalivas (2010). "Ceftriaxone restores glutamate homeostasis and prevents relapse to cocaine seeking." *Biol Psychiatry* 67(1): 81-84.
- Knackstedt, L. A., K. Moussawi, R. Lalumiere, M. Schwendt, M. Klugmann and P. W. Kalivas (2010). "Extinction training after cocaine self-administration induces glutamatergic plasticity to inhibit cocaine seeking." *J Neurosci* 30(23): 7984-7992.
- Koob, G. F. (1992). "Neural mechanisms of drug reinforcement." *Ann N Y Acad Sci* 654: 171-191.
- Koob, G. F. and F. E. Bloom (1988). "Cellular and molecular mechanisms of drug dependence." *Science* 242(4879): 715-723.
- Koob, G. F. and E. P. Zorrilla (2010). "Neurobiological mechanisms of addiction: focus on corticotropin-releasing factor." *Curr Opin Investig Drugs* 11(1): 63-71.
- Korotkova, T. M., R. E. Brown, O. A. Sergeeva, A. A. Ponomarenko and H. L. Haas (2006). "Effects of arousal- and feeding-related neuropeptides on dopaminergic and GABAergic neurons in the ventral tegmental area of the rat." *Eur J Neurosci* 23(10): 2677-2685.
- Kosten, T. R., F. H. Gawin, B. J. Rounsaville and H. D. Kleber (1986). "Cocaine abuse among opioid addicts: demographic and diagnostic factors in treatment." *Am J Drug Alcohol Abuse* 12(1-2): 1-16.
- Kourrich, S., P. E. Rothwell, J. R. Klug and M. J. Thomas (2007). "Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens." *J Neurosci* 27(30): 7921-7928.
- Kuribara, H. and Y. Uchihashi (1993). "Dopamine antagonists can inhibit methamphetamine sensitization, but not cocaine sensitization, when assessed by ambulatory activity in mice." *J Pharm Pharmacol* 45(12): 1042-1045.
- Kvamme, E., I. A. Torgner and G. Svenneby (1985). "Glutaminase from mammalian tissues." *Methods Enzymol* 113: 241-256.
- LaLumiere, R. T. and P. W. Kalivas (2008). "Glutamate release in the nucleus accumbens core is necessary for heroin seeking." *J Neurosci* 28(12): 3170-3177.
- LaRowe, S. D., H. Myrick, S. Hedden, P. Mardikian, M. Saladin, A. McRae, K. Brady, P. W. Kalivas and R. Malcolm (2007). "Is cocaine desire reduced by N-acetylcysteine?" *Am J Psychiatry* 164(7): 1115-1117.
- Le Moal, M. and G. F. Koob (2007). "Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives." *Eur Neuropsychopharmacol* 17(6-7): 377-393.
- Le Moal, M. and H. Simon (1991). "Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles." *Physiol Rev* 71(1): 155-234.
- Lecca, D., F. Cacciapaglia, V. Valentini, E. Acquas and G. Di Chiara (2007). "Differential neurochemical and behavioral adaptation to cocaine after response contingent and noncontingent exposure in the rat." *Psychopharmacology (Berl)* 191(3): 653-667.
- Lee, B. R. and Y. Dong (2011). "Cocaine-induced metaplasticity in the nucleus accumbens: silent synapse and beyond." *Neuropharmacology* 61(7): 1060-1069.
- Lee, S. G., Z. Z. Su, L. Emdad, P. Gupta, D. Sarkar, A. Borjabad, D. J. Volsky and P. B. Fisher (2008). "Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes." *J Biol Chem* 283(19): 13116-13123.
-

-
- Lehre, K. P., L. M. Levy, O. P. Ottersen, J. Storm-Mathisen and N. C. Danbolt (1995). "Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations." *J Neurosci* 15(3 Pt 1): 1835-1853.
- Leri, F., J. Flores, H. Rajabi and J. Stewart (2003). "Effects of cocaine in rats exposed to heroin." *Neuropsychopharmacology* 28(12): 2102-2116.
- Lerma, J., A. S. Herranz, O. Herreras, V. Abaira and R. Martin del Rio (1986). "In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis." *Brain Res* 384(1): 145-155.
- Lesage, A. and T. Steckler (2010). "Metabotropic glutamate mGlu1 receptor stimulation and blockade: therapeutic opportunities in psychiatric illness." *Eur J Pharmacol* 639(1-3): 2-16.
- Lett, B. T. (1989). "Repeated exposures intensify rather than diminish the rewarding effects of amphetamine, morphine, and cocaine." *Psychopharmacology (Berl)* 98(3): 357-362.
- Levitt, M., S. Spector, A. Sjoerdsma and S. Udenfriend (1965). "Elucidation of the Rate-Limiting Step in Norepinephrine Biosynthesis in the Perfused Guinea-Pig Heart." *J Pharmacol Exp Ther* 148: 1-8.
- Li, Y., A. J. Vartanian, F. J. White, C. J. Xue and M. E. Wolf (1997). "Effects of the AMPA receptor antagonist NBQX on the development and expression of behavioral sensitization to cocaine and amphetamine." *Psychopharmacology (Berl)* 134(3): 266-276.
- Lipton, P. (1999). "Ischemic cell death in brain neurons." *Physiol Rev* 79(4): 1431-1568.
- Lisman, J. and S. Raghavachari (2006). "A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses." *Sci STKE* 2006(356): re11.
- Liu, S. J. and R. S. Zukin (2007). "Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death." *Trends Neurosci* 30(3): 126-134.
- Lu, L., J. D. Shepard, F. S. Hall and Y. Shaham (2003). "Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review." *Neurosci Biobehav Rev* 27(5): 457-491.
- Ludolph, A. C. and C. Munch (1999). "Neurotoxic mechanisms of degeneration in motor neuron diseases." *Drug Metab Rev* 31(3): 619-634.
- Madayag, A., D. Lobner, K. S. Kau, J. R. Mantsch, O. Abdulhameed, M. Hearing, M. D. Grier and D. A. Baker (2007). "Repeated N-acetylcysteine administration alters plasticity-dependent effects of cocaine." *J Neurosci* 27(51): 13968-13976.
- Malherbe, P., C. Kratzeisen, K. Lundstrom, J. G. Richards, R. L. Faull and V. Mutel (1999). "Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the human metabotropic glutamate receptor 8." *Brain Res Mol Brain Res* 67(2): 201-210.
- Malinow, R. (2003). "AMPA receptor trafficking and long-term potentiation." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1432): 707-714.
- Malinow, R. and R. C. Malenka (2002). "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." *Annu Rev Neurosci* 25: 103-126.
- Mameli, M., B. Halbout, C. Creton, D. Engblom, J. R. Parkitna, R. Spanagel and C. Luscher (2009). "Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc." *Nat Neurosci* 12(8): 1036-1041.
-

-
- Mano, I. and V. I. Teichberg (1998). "A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex." *Neuroreport* 9(2): 327-331.
- Mark, G. P., D. S. Blander and B. G. Hoebel (1991). "A conditioned stimulus decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens after the development of a learned taste aversion." *Brain Res* 551(1-2): 308-310.
- Markou, A., F. Weiss, L. H. Gold, S. B. Caine, G. Schulteis and G. F. Koob (1993). "Animal models of drug craving." *Psychopharmacology (Berl)* 112(2-3): 163-182.
- Martin, S., J. M. Henley, D. Holman, M. Zhou, O. Wiegert, M. van Spronsen, M. Joels, C. C. Hoogenraad and H. J. Krugers (2009). "Corticosterone alters AMPAR mobility and facilitates bidirectional synaptic plasticity." *PLoS One* 4(3): e4714.
- Massey, P. V., B. E. Johnson, P. R. Moulton, Y. P. Auberson, M. W. Brown, E. Molnar, G. L. Collingridge and Z. I. Bashir (2004). "Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression." *J Neurosci* 24(36): 7821-7828.
- Mayfield, R. D., G. Larson and N. R. Zahniser (1992). "Cocaine-induced behavioral sensitization and D1 dopamine receptor function in rat nucleus accumbens and striatum." *Brain Res* 573(2): 331-335.
- McBean, G. J. (2002). "Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters." *Trends Pharmacol Sci* 23(7): 299-302.
- McDaid, J., J. E. Dallimore, A. R. Mackie, A. L. Mickiewicz and T. C. Napier (2005). "Cross-sensitization to morphine in cocaine-sensitized rats: behavioral assessments correlate with enhanced responding of ventral pallidal neurons to morphine and glutamate, with diminished effects of GABA." *J Pharmacol Exp Ther* 313(3): 1182-1193.
- McFarland, K., S. B. Davidge, C. C. Lapish and P. W. Kalivas (2004). "Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior." *J Neurosci* 24(7): 1551-1560.
- McFarland, K., C. C. Lapish and P. W. Kalivas (2003). "Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior." *J Neurosci* 23(8): 3531-3537.
- Mead, A. N. and D. N. Stephens (1998). "AMPA-receptors are involved in the expression of amphetamine-induced behavioural sensitisation, but not in the expression of amphetamine-induced conditioned activity in mice." *Neuropharmacology* 37(9): 1131-1138.
- Meldrum, B. S. (1994). "The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders." *Neurology* 44(11 Suppl 8): S14-23.
- Meredith, G. E., B. A. Baldo, M. E. Andrezjewski and A. E. Kelley (2008). "The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions." *Brain Struct Funct* 213(1-2): 17-27.
- Meredith, G. E., T. Farrell, P. Kellaghan, Y. Tan, D. S. Zahm and S. Totterdell (1999). "Immunocytochemical characterization of catecholaminergic neurons in the rat striatum following dopamine-depleting lesions." *Eur J Neurosci* 11(10): 3585-3596.
- Merikangas, K. R., R. L. Mehta, B. E. Molnar, E. E. Walters, J. D. Swendsen, S. Aguilar-Gaziola, R. Bijl, G. Borges, J. J. Caraveo-Anduaga, D. J. DeWit, B. Kolody, W. A. Vega, H. U. Wittchen and R. C. Kessler (1998). "Comorbidity of substance use disorders with mood and anxiety disorders: results of the International Consortium in Psychiatric Epidemiology." *Addict Behav* 23(6): 893-907.
-

-
- Miele, M., M. G. Boutelle and M. Fillenz (1996). "The source of physiologically stimulated glutamate efflux from the striatum of conscious rats." *J Physiol* 497 (Pt 3): 745-751.
- Miller, B. R., J. L. Dorner, M. Shou, Y. Sari, S. J. Barton, D. R. Sengelaub, R. T. Kennedy and G. V. Rebec (2008). "Up-regulation of GLT1 expression increases glutamate uptake and attenuates the Huntington's disease phenotype in the R6/2 mouse." *Neuroscience* 153(1): 329-337.
- Mitani, A. and K. Tanaka (2003). "Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: an in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1." *J Neurosci* 23(18): 7176-7182.
- Mitchell, J. B. and J. Stewart (1990). "Facilitation of sexual behaviors in the male rat in the presence of stimuli previously paired with systemic injections of morphine." *Pharmacol Biochem Behav* 35(2): 367-372.
- Mogenson, G. J., D. L. Jones and C. Y. Yim (1980). "From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system." *Prog Neurobiol* 14(2-3): 69-97.
- Mogenson, G. J., L. W. Swanson and M. Wu (1985). "Evidence that projections from substantia innominata to zona incerta and mesencephalic locomotor region contribute to locomotor activity." *Brain Res* 334(1): 65-76.
- Moran, M. M., K. McFarland, R. I. Melendez, P. W. Kalivas and J. K. Seamans (2005). "Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking." *J Neurosci* 25(27): 6389-6393.
- Morishita, W., W. Lu, G. B. Smith, R. A. Nicoll, M. F. Bear and R. C. Malenka (2007). "Activation of NR2B-containing NMDA receptors is not required for NMDA receptor-dependent long-term depression." *Neuropharmacology* 52(1): 71-76.
- Moriyama, Y., M. Hayashi, H. Yamada, S. Yatsushiro, S. Ishio and A. Yamamoto (2000). "Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones." *J Exp Biol* 203(Pt 1): 117-125.
- Moussawi, K., A. Pacchioni, M. Moran, M. F. Olive, J. T. Gass, A. Lavin and P. W. Kalivas (2009). "N-Acetylcysteine reverses cocaine-induced metaplasticity." *Nat Neurosci* 12(2): 182-189.
- Moussawi, K., W. Zhou, H. Shen, C. M. Reichel, R. E. See, D. B. Carr and P. W. Kalivas (2011). "Reversing cocaine-induced synaptic potentiation provides enduring protection from relapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(1): 385-390.
- Mullings, J. L., D. J. Hartley and J. W. Marquart (2004). "Exploring the relationship between alcohol use, childhood maltreatment, and treatment needs among female prisoners." *Subst Use Misuse* 39(2): 277-305.
- Nagatsu, T., M. Levitt and S. Udenfriend (1964). "Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis." *J Biol Chem* 239: 2910-2917.
- Nestler, E. J. (1992). "Molecular mechanisms of drug addiction." *J Neurosci* 12(7): 2439-2450.
- Newcomb, M. D. and P. M. Bentler (1988). "Impact of adolescent drug use and social support on problems of young adults: a longitudinal study." *J Abnorm Psychol* 97(1): 64-75.
- Newpher, T. M. and M. D. Ehlers (2008). "Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains." *Neuron* 58(4): 472-497.
-

-
- Nicola, S. M. (2010). "The flexible approach hypothesis: unification of effort and cue-responding hypotheses for the role of nucleus accumbens dopamine in the activation of reward-seeking behavior." *J Neurosci* 30(49): 16585-16600.
- Nicola, S. M. and S. A. Deadwyler (2000). "Firing rate of nucleus accumbens neurons is dopamine-dependent and reflects the timing of cocaine-seeking behavior in rats on a progressive ratio schedule of reinforcement." *J Neurosci* 20(14): 5526-5537.
- Nimchinsky, E. A., B. L. Sabatini and K. Svoboda (2002). "Structure and function of dendritic spines." *Annu Rev Physiol* 64: 313-353.
- Ohishi, H., C. Akazawa, R. Shigemoto, S. Nakanishi and N. Mizuno (1995). "Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain." *J Comp Neurol* 360(4): 555-570.
- Olive, M. F. (2009). "Metabotropic glutamate receptor ligands as potential therapeutics for addiction." *Curr Drug Abuse Rev* 2(1): 83-98.
- Ompad, D. C., R. M. Ikeda, N. Shah, C. M. Fuller, S. Bailey, E. Morse, P. Kerndt, C. Maslow, Y. Wu, D. Vlahov, R. Garfein and S. A. Strathdee (2005). "Childhood sexual abuse and age at initiation of injection drug use." *Am J Public Health* 95(4): 703-709.
- Ortinski, P. I., F. M. Vassoler, G. C. Carlson and R. C. Pierce (2012). "Temporally dependent changes in cocaine-induced synaptic plasticity in the nucleus accumbens shell are reversed by D1-like dopamine receptor stimulation." *Neuropsychopharmacology* 37(7): 1671-1682.
- Osler, M., A. M. Andersen, B. Laursen and D. A. Lawlor (2007). "Cognitive function in childhood and early adulthood and injuries later in life: the Metropolit 1953 male birth cohort." *Int J Epidemiol* 36(1): 212-219.
- Ottersen, O. P. and A. S. Landsend (1997). "Organization of glutamate receptors at the synapse." *Eur J Neurosci* 9(11): 2219-2224.
- Ottersen, O. P. and J. Storm-Mathisen (1984). "Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique." *J Comp Neurol* 229(3): 374-392.
- Ouimette, P., D. Coolhart, J. S. Funderburk, M. Wade and P. J. Brown (2007). "Precipitants of first substance use in recently abstinent substance use disorder patients with PTSD." *Addict Behav* 32(8): 1719-1727.
- Pacchioni, A. M., M. Cador, C. Bregonzio and L. M. Cancela (2007). "A glutamate-dopamine interaction in the persistent enhanced response to amphetamine in nucleus accumbens core but not shell following a single restraint stress." *Neuropsychopharmacology* 32(3): 682-692.
- Pacchioni, A. M., G. Gioino, A. Assis and L. M. Cancela (2002). "A single exposure to restraint stress induces behavioral and neurochemical sensitization to stimulating effects of amphetamine: involvement of NMDA receptors." *Ann N Y Acad Sci* 965: 233-246.
- Papouin, T., L. Ladepeche, J. Ruel, S. Sacchi, M. Labasque, M. Hanini, L. Groc, L. Pollegioni, J. P. Mothet and S. H. Oliet (2012). "Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists." *Cell* 150(3): 633-646.
- Patneau, D. K. and M. L. Mayer (1990). "Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors." *J Neurosci* 10(7): 2385-2399.
-

-
- Paulson, P. E., D. M. Camp and T. E. Robinson (1991). "Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats." *Psychopharmacology (Berl)* 103(4): 480-492.
- Paulson, P. E. and T. E. Robinson (1995). "Amphetamine-induced time-dependent sensitization of dopamine neurotransmission in the dorsal and ventral striatum: a microdialysis study in behaving rats." *Synapse* 19(1): 56-65.
- Pendyam, S., A. Mohan, P. W. Kalivas and S. S. Nair (2009). "Computational model of extracellular glutamate in the nucleus accumbens incorporates neuroadaptations by chronic cocaine." *Neuroscience* 158(4): 1266-1276.
- Pennartz, C. M., H. J. Groenewegen and F. H. Lopes da Silva (1994). "The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data." *Prog Neurobiol* 42(6): 719-761.
- Peris, J. and N. R. Zahniser (1987). "One injection of cocaine produces a long-lasting increase in [3H]-dopamine release." *Pharmacol Biochem Behav* 27(3): 533-535.
- Peters, J. and P. W. Kalivas (2006). "The group II metabotropic glutamate receptor agonist, LY379268, inhibits both cocaine- and food-seeking behavior in rats." *Psychopharmacology (Berl)* 186(2): 143-149.
- Peters, J., P. W. Kalivas and G. J. Quirk (2009). "Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex." *Learn Mem* 16(5): 279-288.
- Petralia, R. S. (2012). "Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons." *ScientificWorldJournal* 2012: 267120.
- Piazza, P. V., J. M. Deminiere, M. le Moal and H. Simon (1990). "Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration." *Brain Res* 514(1): 22-26.
- Piazza, P. V. and M. Le Moal (1998). "The role of stress in drug self-administration." *Trends Pharmacol Sci* 19(2): 67-74.
- Piazza, P. V. and M. L. Le Moal (1996). "Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 359-378.
- Pierce, R. C., K. Bell, P. Duffy and P. W. Kalivas (1996). "Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization." *J Neurosci* 16(4): 1550-1560.
- Pierce, R. C. and P. W. Kalivas (1995). "Amphetamine produces sensitized increases in locomotion and extracellular dopamine preferentially in the nucleus accumbens shell of rats administered repeated cocaine." *J Pharmacol Exp Ther* 275(2): 1019-1029.
- Pierce, R. C. and P. W. Kalivas (1997). "A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants." *Brain Res Brain Res Rev* 25(2): 192-216.
- Pin, J. P. and R. Duvoisin (1995). "The metabotropic glutamate receptors: structure and functions." *Neuropharmacology* 34(1): 1-26.
-

-
- Pontieri, F. E., G. Tanda and G. Di Chiara (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 U S A* 92(26): 12304-12308.
- Post, R. M. (1980). "Intermittent versus continuous stimulation: effect of time interval on the development of sensitization or tolerance." *Life Sci* 26(16): 1275-1282.
- Post, R. M., S. R. Weiss, D. Fontana and A. Pert (1992). "Conditioned sensitization to the psychomotor stimulant cocaine." *Ann N Y Acad Sci* 654: 386-399.
- Rao, V. L., A. Dogan, K. K. Bowen, K. G. Todd and R. J. Dempsey (2001). "Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1 exacerbates hippocampal neuronal damage following traumatic injury to rat brain." *Eur J Neurosci* 13(1): 119-128.
- Rasmussen, B., E. M. Unterwald and S. M. Rawls (2011). "Glutamate transporter subtype 1 (GLT-1) activator ceftriaxone attenuates amphetamine-induced hyperactivity and behavioral sensitization in rats." *Drug Alcohol Depend* 118(2-3): 484-488.
- Rasmussen, B. A., D. A. Baron, J. K. Kim, E. M. Unterwald and S. M. Rawls (2011). "beta-Lactam antibiotic produces a sustained reduction in extracellular glutamate in the nucleus accumbens of rats." *Amino Acids* 40(2): 761-764.
- Rawls, S. M., F. Cavallo, A. Capasso, Z. Ding and R. B. Raffa (2008). "The beta-lactam antibiotic ceftriaxone inhibits physical dependence and abstinence-induced withdrawal from cocaine, amphetamine, methamphetamine, and clorazepate in planarians." *Eur J Pharmacol* 584(2-3): 278-284.
- Rawls, S. M., M. Zielinski, H. Patel, S. Sacavage, D. A. Baron and D. Patel (2010). "Beta-lactam antibiotic reduces morphine analgesic tolerance in rats through GLT-1 transporter activation." *Drug Alcohol Depend* 107(2-3): 261-263.
- Reed, M. B., R. Wang, A. M. Shillington, J. D. Clapp and J. E. Lange (2007). "The relationship between alcohol use and cigarette smoking in a sample of undergraduate college students." *Addict Behav* 32(3): 449-464.
- Reid, M. S. and S. P. Berger (1996). "Evidence for sensitization of cocaine-induced nucleus accumbens glutamate release." *Neuroreport* 7(7): 1325-1329.
- Reid, M. S., K. Hsu, Jr. and S. P. Berger (1997). "Cocaine and amphetamine preferentially stimulate glutamate release in the limbic system: studies on the involvement of dopamine." *Synapse* 27(2): 95-105.
- Reimers, J. M., M. Milovanovic and M. E. Wolf (2011). "Quantitative analysis of AMPA receptor subunit composition in addiction-related brain regions." *Brain Res* 1367: 223-233.
- Richman, H. and B. C. Frueh (1996). "Personality disorder symptomatology among Vietnam veterans with combat-related PTSD." *Anxiety* 2(6): 286-295.
- Ritz, M. C., R. J. Lamb, S. R. Goldberg and M. J. Kuhar (1987). "Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine." *Science* 237(4819): 1219-1223.
- Robinson, T. E. (1984). "Behavioral sensitization: characterization of enduring changes in rotational behavior produced by intermittent injections of amphetamine in male and female rats." *Psychopharmacology (Berl)* 84(4): 466-475.
- Robinson, T. E., A. L. Angus and J. B. Becker (1985). "Sensitization to stress: the enduring effects of prior stress on amphetamine-induced rotational behavior." *Life Sci* 37(11): 1039-1042.
-

-
- Robinson, T. E. and J. B. Becker (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): 157-198.
- Robinson, T. E., J. B. Becker and S. K. Presty (1982). "Long-term facilitation of amphetamine-induced rotational behavior and striatal dopamine release produced by a single exposure to amphetamine: sex differences." *Brain Res* 253(1-2): 231-241.
- Robinson, T. E. and K. C. Berridge (1993). "The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction." *Brain Res Brain Res Rev* 18(3): 247-291.
- Robinson, T. E. and K. C. Berridge (2000). "The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view." *Addiction* 95 Suppl 2: S91-117.
- Robinson, T. E. and K. C. Berridge (2001). "Incentive-sensitization and addiction." *Addiction* 96(1): 103-114.
- Robinson, T. E., K. E. Browman, H. S. Crombag and A. Badiani (1998). "Modulation of the induction or expression of psychostimulant sensitization by the circumstances surrounding drug administration." *Neurosci Biobehav Rev* 22(2): 347-354.
- Robinson, T. E. and B. Kolb (2004). "Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse." *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 33-46.
- Rosenmund, C., Y. Stern-Bach and C. F. Stevens (1998). "The tetrameric structure of a glutamate receptor channel." *Science* 280(5369): 1596-1599.
- Rothstein, J. D., S. Patel, M. R. Regan, C. Haenggeli, Y. H. Huang, D. E. Bergles, L. Jin, M. Dykes Hoberg, S. Vidensky, D. S. Chung, S. V. Toan, L. I. Bruijn, Z. Z. Su, P. Gupta and P. B. Fisher (2005). "Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression." *Nature* 433(7021): 73-77.
- Rouge-Pont, F., M. Marinelli, M. Le Moal, H. Simon and P. V. Piazza (1995). "Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion." *J Neurosci* 15(11): 7189-7195.
- Rouge-Pont, F., P. V. Piazza, M. Kharouby, M. Le Moal and H. Simon (1993). "Higher and longer stress-induced increase in dopamine concentrations in the nucleus accumbens of animals predisposed to amphetamine self-administration. A microdialysis study." *Brain Res* 602(1): 169-174.
- Saal, D., Y. Dong, A. Bonci and R. C. Malenka (2003). "Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons." *Neuron* 37(4): 577-582.
- Sari, Y., K. D. Smith, P. K. Ali and G. V. Rebec (2009). "Upregulation of GLT1 attenuates cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats." *J Neurosci* 29(29): 9239-9243.
- Sato, H., M. Tamba, S. Okuno, K. Sato, K. Keino-Masu, M. Masu and S. Bannai (2002). "Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain." *J Neurosci* 22(18): 8028-8033.
- Schmaal, L., D. J. Veltman, A. Nederveen, W. van den Brink and A. E. Goudriaan (2012). "N-acetylcysteine normalizes glutamate levels in cocaine-dependent patients: a randomized crossover magnetic resonance spectroscopy study." *Neuropsychopharmacology* 37(9): 2143-2152.
- Schousboe, A. (1981). "Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells." *Int Rev Neurobiol* 22: 1-45.
-

-
- Schumann, J. and R. Yaka (2009). "Prolonged withdrawal from repeated noncontingent cocaine exposure increases NMDA receptor expression and ERK activity in the nucleus accumbens." *J Neurosci* 29(21): 6955-6963.
- Self, D. W. and K. H. Choi (2004). "Extinction-induced neuroplasticity attenuates stress-induced cocaine seeking: a state-dependent learning hypothesis." *Stress* 7(3): 145-155.
- Sepkuty, J. P., A. S. Cohen, C. Eccles, A. Rafiq, K. Behar, R. Ganel, D. A. Coulter and J. D. Rothstein (2002). "A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy." *J Neurosci* 22(15): 6372-6379.
- Sesack, S. R., A. Y. Deutch, R. H. Roth and B. S. Bunney (1989). "Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin." *J Comp Neurol* 290(2): 213-242.
- Sesack, S. R. and V. M. Pickel (1990). "In the rat medial nucleus accumbens, hippocampal and catecholaminergic terminals converge on spiny neurons and are in apposition to each other." *Brain Res* 527(2): 266-279.
- Shaham, Y., K. Alvares, S. M. Nespore and N. E. Grunberg (1992). "Effect of stress on oral morphine and fentanyl self-administration in rats." *Pharmacol Biochem Behav* 41(3): 615-619.
- Shaham, Y., U. Shalev, L. Lu, H. De Wit and J. Stewart (2003). "The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings." *Psychopharmacology (Berl)* 168(1-2): 3-20.
- Shaw, P. J. (1999). "Motor neurone disease." *BMJ* 318(7191): 1118-1121.
- Shelton, M. K. and K. D. McCarthy (1999). "Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ." *Glia* 26(1): 1-11.
- Shen, H., K. Moussawi, W. Zhou, S. Toda and P. W. Kalivas (2011). "Heroin relapse requires long-term potentiation-like plasticity mediated by NMDA2b-containing receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(48): 19407-19412.
- Shen, H. W., M. D. Scofield, H. Boger, M. Hensley and P. W. Kalivas (2014). "Synaptic glutamate spillover due to impaired glutamate uptake mediates heroin relapse." *J Neurosci* 34(16): 5649-5657.
- Shen, H. W., S. Toda, K. Moussawi, A. Bouknight, D. S. Zahm and P. W. Kalivas (2009). "Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats." *J Neurosci* 29(9): 2876-2884.
- Shepherd, J. D. and R. L. Huganir (2007). "The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking." *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 613-643.
- Shippenberg, T. S., A. LeFevour and A. C. Thompson (1998). "Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine and cocaine: differential effects of the kappa-opioid receptor agonist U69593." *Eur J Pharmacol* 345(1): 27-34.
- Sinha, R. (2001). "How does stress increase risk of drug abuse and relapse?" *Psychopharmacology (Berl)* 158(4): 343-359.
- Sinha, R., M. Garcia, P. Paliwal, M. J. Kreek and B. J. Rounsaville (2006). "Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes." *Arch Gen Psychiatry* 63(3): 324-331.
- Small, D. L., P. Morley and A. M. Buchan (1999). "Biology of ischemic cerebral cell death." *Prog Cardiovasc Dis* 42(3): 185-207.
-

-
- Smith, J. A., Q. Mo, H. Guo, P. M. Kunko and S. E. Robinson (1995). "Cocaine increases extraneuronal levels of aspartate and glutamate in the nucleus accumbens." *Brain Res* 683(2): 264-269.
- Sofuoglu, M., A. J. Waters, M. Mooney and T. Kosten (2008). "Riluzole and D-amphetamine interactions in humans." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(1): 16-22.
- Song, I. and R. L. Huganir (2002). "Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity." *Trends Neurosci* 25(11): 578-588.
- Spencer, P. S. (1999). "Food toxins, ampa receptors, and motor neuron diseases." *Drug Metab Rev* 31(3): 561-587.
- Stefanik, M. T., K. Moussawi, Y. M. Kupchik, K. C. Smith, R. L. Miller, M. L. Huff, K. Deisseroth, P. W. Kalivas and R. T. LaLumiere (2013). "Optogenetic inhibition of cocaine seeking in rats." *Addict Biol* 18(1): 50-53.
- Steinhauser, C. and V. Gallo (1996). "News on glutamate receptors in glial cells." *Trends Neurosci* 19(8): 339-345.
- Stewart, J. and A. Badiani (1993). "Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs." *Behav Pharmacol* 4(4): 289-312.
- Stewart, J. and J. P. Druhan (1993). "Development of both conditioning and sensitization of the behavioral activating effects of amphetamine is blocked by the non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801." *Psychopharmacology (Berl)* 110(1-2): 125-132.
- Suto, N., L. E. Ecke, Z. B. You and R. A. Wise (2010). "Extracellular fluctuations of dopamine and glutamate in the nucleus accumbens core and shell associated with lever-pressing during cocaine self-administration, extinction, and yoked cocaine administration." *Psychopharmacology (Berl)* 211(3): 267-275.
- Suto, N., L. M. Tanabe, J. D. Austin, E. Creekmore, C. T. Pham and P. Vezina (2004). "Previous exposure to psychostimulants enhances the reinstatement of cocaine seeking by nucleus accumbens AMPA." *Neuropsychopharmacology* 29(12): 2149-2159.
- Swendsen, J., K. P. Conway, L. Degenhardt, L. Dierker, M. Glantz, R. Jin, K. R. Merikangas, N. Sampson and R. C. Kessler (2009). "Socio-demographic risk factors for alcohol and drug dependence: the 10-year follow-up of the national comorbidity survey." *Addiction* 104(8): 1346-1355.
- Swendsen, J., K. P. Conway, L. Degenhardt, M. Glantz, R. Jin, K. R. Merikangas, N. Sampson and R. C. Kessler (2010). "Mental disorders as risk factors for substance use, abuse and dependence: results from the 10-year follow-up of the National Comorbidity Survey." *Addiction* 105(6): 1117-1128.
- Swendsen, J. D., K. P. Conway, B. J. Rounsaville and K. R. Merikangas (2002). "Are personality traits familial risk factors for substance use disorders? Results of a controlled family study." *Am J Psychiatry* 159(10): 1760-1766.
- Takamori, S. (2006). "VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research?" *Neurosci Res* 55(4): 343-351.
- Tanaka, K., K. Watase, T. Manabe, K. Yamada, M. Watanabe, K. Takahashi, H. Iwama, T. Nishikawa, N. Ichihara, T. Kikuchi, S. Okuyama, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto and K. Wada (1997). "Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1." *Science* 276(5319): 1699-1702.
-

-
- Tapper, A. R., S. L. McKinney, R. Nashmi, J. Schwarz, P. Deshpande, C. Labarca, P. Whiteaker, M. J. Marks, A. C. Collins and H. A. Lester (2004). "Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization." *Science* 306(5698): 1029-1032.
- Thomas, M. J., C. Beurrier, A. Bonci and R. C. Malenka (2001). "Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine." *Nat Neurosci* 4(12): 1217-1223.
- Timmerman, W. and B. H. Westerink (1997). "Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify?" *Synapse* 27(3): 242-261.
- Toda, S., H. W. Shen, J. Peters, S. Cagle and P. W. Kalivas (2006). "Cocaine increases actin cycling: effects in the reinstatement model of drug seeking." *J Neurosci* 26(5): 1579-1587.
- Triffleman, E. G., C. R. Marmar, K. L. Delucchi and H. Ronfeldt (1995). "Childhood trauma and posttraumatic stress disorder in substance abuse inpatients." *J Nerv Ment Dis* 183(3): 172-176.
- Triller, A. and D. Choquet (2003). "Synaptic structure and diffusion dynamics of synaptic receptors." *Biol Cell* 95(7): 465-476.
- Trussell, L. O. and G. D. Fischbach (1989). "Glutamate receptor desensitization and its role in synaptic transmission." *Neuron* 3(2): 209-218.
- Tzschentke, T. M. and W. J. Schmidt (1997). "Interactions of MK-801 and GYKI 52466 with morphine and amphetamine in place preference conditioning and behavioural sensitization." *Behav Brain Res* 84(1-2): 99-107.
- Ujike, H., T. Onoue, K. Akiyama, T. Hamamura and S. Otsuki (1989). "Effects of selective D-1 and D-2 dopamine antagonists on development of methamphetamine-induced behavioral sensitization." *Psychopharmacology (Berl)* 98(1): 89-92.
- Ungless, M. A., V. Singh, T. L. Crowder, R. Yaka, D. Ron and A. Bonci (2003). "Corticotropin-releasing factor requires CRF binding protein to potentiate NMDA receptors via CRF receptor 2 in dopamine neurons." *Neuron* 39(3): 401-407.
- Vanderschuren, L. J. and P. W. Kalivas (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, L. J. and R. C. Pierce (2010). "Sensitization processes in drug addiction." *Curr Top Behav Neurosci* 3: 179-195.
- Vanderschuren, L. J., E. D. Schmidt, T. J. De Vries, C. A. Van Moorsel, F. J. Tilders and A. N. Schoffelmeer (1999). "A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats." *J Neurosci* 19(21): 9579-9586.
- Vanderschuren, L. J., G. H. Tjon, P. Nestby, A. H. Mulder, A. N. Schoffelmeer and T. J. De Vries (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): 115-122.
- Vernadakis, A. (1996). "Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity." *Prog Neurobiol* 49(3): 185-214.
- Vezina, P. (2004). "Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs." *Neurosci Biobehav Rev* 27(8): 827-839.
-

-
- Vezina, P., D. S. Lorrain, G. M. Arnold, J. D. Austin and N. Suto (2002). "Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity promotes the pursuit of amphetamine." *J Neurosci* 22(11): 4654-4662.
- Vezina, P. and J. Stewart (1989). "The effect of dopamine receptor blockade on the development of sensitization to the locomotor activating effects of amphetamine and morphine." *Brain Res* 499(1): 108-120.
- Voorn, P., L. J. Vanderschuren, H. J. Groenewegen, T. W. Robbins and C. M. Pennartz (2004). "Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum." *Trends Neurosci* 27(8): 468-474.
- Waldhoer, M., S. E. Bartlett and J. L. Whistler (2004). "Opioid receptors." *Annu Rev Biochem* 73: 953-990.
- Wanat, M. J. and A. Bonci (2008). "Dose-dependent changes in the synaptic strength on dopamine neurons and locomotor activity after cocaine exposure." *Synapse* 62(10): 790-795.
- Wang, B., Y. Shaham, D. Zitzman, S. Azari, R. A. Wise and Z. B. You (2005). "Cocaine experience establishes control of midbrain glutamate and dopamine by corticotropin-releasing factor: a role in stress-induced relapse to drug seeking." *J Neurosci* 25(22): 5389-5396.
- Wang, B., Z. B. You, K. C. Rice and R. A. Wise (2007). "Stress-induced relapse to cocaine seeking: roles for the CRF(2) receptor and CRF-binding protein in the ventral tegmental area of the rat." *Psychopharmacology (Berl)* 193(2): 283-294.
- Wang, X., K. Moussawi, L. Knackstedt, H. Shen and P. W. Kalivas (2013). "Role of mGluR5 neurotransmission in reinstated cocaine-seeking." *Addict Biol* 18(1): 40-49.
- Warner, L. A., R. C. Kessler, M. Hughes, J. C. Anthony and C. B. Nelson (1995). "Prevalence and correlates of drug use and dependence in the United States. Results from the National Comorbidity Survey." *Arch Gen Psychiatry* 52(3): 219-229.
- Warr, O., M. Takahashi and D. Attwell (1999). "Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange." *J Physiol* 514 (Pt 3): 783-793.
- Watt, A. J., P. J. Sjöström, M. Hausser, S. B. Nelson and G. G. Turrigiano (2004). "A proportional but slower NMDA potentiation follows AMPA potentiation in LTP." *Nat Neurosci* 7(5): 518-524.
- Weitlauf, C., Y. Hönse, Y. P. Auberson, M. Mishina, D. M. Lovinger and D. G. Winder (2005). "Activation of NR2A-containing NMDA receptors is not obligatory for NMDA receptor-dependent long-term potentiation." *J Neurosci* 25(37): 8386-8390.
- White, F. J., X. T. Hu, X. F. Zhang and M. E. Wolf (1995). "Repeated administration of cocaine or amphetamine alters neuronal responses to glutamate in the mesoaccumbens dopamine system." *J Pharmacol Exp Ther* 273(1): 445-454.
- Wise, R. A. (1996). "Neurobiology of addiction." *Curr Opin Neurobiol* 6(2): 243-251.
- Wise, R. A. (2004). "Dopamine, learning and motivation." *Nat Rev Neurosci* 5(6): 483-494.
- Wise, R. A. and M. A. Bozarth (1987). "A psychomotor stimulant theory of addiction." *Psychol Rev* 94(4): 469-492.
- Wise, R. A. and P. P. Rompre (1989). "Brain dopamine and reward." *Annu Rev Psychol* 40: 191-225.
- Wolf, M. E., S. L. Dahlin, X. T. Hu, C. J. Xue and K. White (1995). "Effects of lesions of prefrontal cortex, amygdala, or fornix on behavioral sensitization to amphetamine: comparison with N-methyl-D-aspartate antagonists." *Neuroscience* 69(2): 417-439.
-

-
- Wolf, M. E. and C. R. Ferrario (2010). "AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine." *Neurosci Biobehav Rev* 35(2): 185-211.
- Wolf, M. E. and M. Jeziorski (1993). "Coadministration of MK-801 with amphetamine, cocaine or morphine prevents rather than transiently masks the development of behavioral sensitization." *Brain Res* 613(2): 291-294.
- Wright, C. I., A. V. Beijer and H. J. Groenewegen (1996). "Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized." *J Neurosci* 16(5): 1877-1893.
- Wright, C. I. and H. J. Groenewegen (1995). "Patterns of convergence and segregation in the medial nucleus accumbens of the rat: relationships of prefrontal cortical, midline thalamic, and basal amygdaloid afferents." *J Comp Neurol* 361(3): 383-403.
- Wright, C. I. and H. J. Groenewegen (1996). "Patterns of overlap and segregation between insular cortical, intermediodorsal thalamic and basal amygdaloid afferents in the nucleus accumbens of the rat." *Neuroscience* 73(2): 359-373.
- Wyvell, C. L. and K. C. Berridge (2001). "Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: increased cue-triggered "wanting" for sucrose reward." *J Neurosci* 21(19): 7831-7840.
- Yap, J. J. and K. A. Miczek (2008). "Stress and Rodent Models of Drug Addiction: Role of VTA-Accumbens-PFC-Amygdala Circuit." *Drug Discov Today Dis Models* 5(4): 259-270.
- Ye, Z. C., J. D. Rothstein and H. Sontheimer (1999). "Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange." *J Neurosci* 19(24): 10767-10777.
- Yoo, J. H., E. M. Yang, S. Y. Lee, H. H. Loh, I. K. Ho and C. G. Jang (2003). "Differential effects of morphine and cocaine on locomotor activity and sensitization in mu-opioid receptor knockout mice." *Neurosci Lett* 344(1): 37-40.
- Zahm, D. S. (2000). "An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens." *Neurosci Biobehav Rev* 24(1): 85-105.
- Zahm, D. S. and J. S. Brog (1992). "On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum." *Neuroscience* 50(4): 751-767.
-