



**ROL DE LA MICROGLÍA EN LA DESREGULACIÓN DE LA
HOMEOSTASIS DE GLUTAMATO EN NÚCLEO ACCUMBENS EN
UN MODELO EXPERIMENTAL DE ESTRÉS CRÓNICO Y
VULNERABILIDAD A LA ADICCIÓN A COCAÍNA**

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Bioquímica María Paula Avalos

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Farmacología

IFEC-CONICET

Argentina

2021

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Liliana Marina Cancela

MIEMBROS DE LA COMISIÓN DE TESIS

Dra. Miriam Beatriz Virgolini

Dr. Pablo Iribarren

Dr. Pablo Héctor Horacio López

EVALUADORA EXTERNA

Dra. Ana María Genaro

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, Argentina (FCQ-UNC) de acuerdo a la reglamentación vigente en dicha Facultad para optar por el título de Doctor en Ciencias Químicas.

Durante la ejecución de este trabajo, la autora fue becaria del CONICET (2014-2019), contó con acreditación del Comité de cuidado de animales (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (Resolución Decanato FCQ-UNC 781/2018) para realizar procedimientos con animales de experimentación, cumplimentó con los cursos requeridos por el reglamento de la carrera de doctorado y se desempeñó como Profesor Asistente en el Departamento de Farmacología. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por el CONICET (PID 11420110100354 y 22920180100029CO), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC; Res., 203/14, 212/16, 411/18 y 472/18) y el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT; BID PICT 2012-1867 y 2015-1622).

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento se extiende a todas las personas presentes en mi mente y mi corazón, quienes caminaron a mi lado, dentro y fuera del laboratorio, durante estos años de gran aprendizaje y crecimiento tanto profesional como personal. Personas que hoy están presentes y aquellas que ya no están, con las que tuve la bendición de compartir inolvidables momentos de mi vida e indudablemente dejaron huellas en mi corazón. Todas estas personas que a su modo me enseñaron, han sido mis grandes maestros profesionales y de la vida, personas de las que aprendí, con las que crecí y de las cuales estaré eternamente agradecida.

Brevemente deseo agradecer, de un modo especial, a quienes participaron activamente en el desarrollo de esta tesis:

A la Dra. Liliana Cancela, por dirigir este estudio, por su gran capacidad de escucha y comprensión en los momentos difíciles, por sus consejos, su gran generosidad, solidez académica y criterio científico que permiten, a todas las personas formadas en su laboratorio, alcanzar un elevado nivel académico.

A la Comisión Asesora/Evaluadora de Tesis, por sus valiosos aportes, sugerencias y consejos.

A la Dra. Ana María Genaro, por aceptar evaluar este trabajo de tesis.

Al grupo de la Dra. Cancela: Andrea Guzmán, Marianela Sánchez, Daiana Rigoni, Julieta Boesio, Pía Lazarini, Flavia Bollati, Bethania Mongi Bragato y Axel Gorostiza por su valiosa ayuda en los experimentos y por tantos momentos compartidos durante estos años. Mi gratitud también se extiende a quienes fueron parte del laboratorio cuando inicié el doctorado: Constanza García Keller, Alejandra Esparza, Mariana Bartos y Laura De Giovanni. Trabajar con todo el grupo ha sido una gran experiencia, repleta de desafíos y aprendizajes que atesoraré por siempre. No se imaginan cuanto me enseñaron y crecí a su lado.

A Constanza, Bethania y Flavia, por recibirme y guiar mis primeros pasos en el laboratorio, por contribuir generosamente a mi formación profesional, incluso actualmente.

A Estela Salde, Lorena Mercado y Leandro Oliveros, por su compromiso y dedicación, por sus valiosas contribuciones y excelente soporte técnico en los experimentos.

A Javier Reparaz, Yanina Altamirano, Nicolás Jaime y Walter Raquena, por su valioso trabajo y excelente soporte técnico en cuanto al cuidado de animales de experimentación.

Al Dr. Gastón Calfa, por las valiosas discusiones en cuanto a espinas dendríticas.

A los Dres. Carlos Mas, Cecilia Sanpedro, Gonzalo Quassolo y Pilar Crespo del Centro de Microscopía – CEMINCO, por sus valiosas contribuciones y excelente soporte técnico en Microscopía Confocal.

Al grupo del Dr. Iribarren (CIBICI-CONICET, Dpto. de Bioquímica Clínica, FCQ, UNC), por su colaboración al permitirme emplear el equipo StepOne Plus para realizar PCR real time. Particularmente, al Dr. Javier Peralta Ramos y a la Dra. Daniela Arroyo por su especial contribución.

A la Dra. Alicia Torres (Directora del Centro de Microscopía electrónica/INICSA - CONICET), por su colaboración al permitirme utilizar el equipo NanoDrop 2000c y especialmente al Biol. Ezequiel Grondona, por su gran colaboración y compañía al momento de realizar las mediciones.

Al Dr. Eduardo Perassi (INFIQC-CONICET, Dpto. de Química Teórica y Computacional, FCQ, UNC), por su valiosa y generosa colaboración al realizar el análisis de datos mediante el Software Matlab.

Al Ing. Juan Cruz Bigliani (LIADE, FCFyN, UNC), por su gran compromiso y contribución en cuanto a la programación del Software Med-PC para la recolección de datos del experimento de autoadministración.

A Laboratorios Raymos representado por los Directores Técnicos Carlos González y Fernando Pennacchio, por la generosa donación de Clorhidrato de Minociclina indispensable para llevar a cabo los experimentos de este trabajo de tesis.

A Franco Brunello, mi primo, por su tiempo y ayuda incondicional para retirar las donaciones de Laboratorios Raymos y enviarlas desde Buenos Aires.

A la empresa UniFarma S.A. representada por el Sr. Nestor Mosca, por la generosa donación de membranas de diálisis indispensables para la construcción de las *probes* de microdiálisis.

A todos los profesores, especialmente a los de Farmacología y Toxicología, compañeros de trabajo y personal administrativo del IFEC-CONICET y Dpto. de Farmacología, FCQ, UNC por tantos momentos compartidos.

A la Facultad de Ciencias Químicas conformada por un gran cuerpo de profesionales de excelencia que generan e imparten conocimiento permitiendo la formación de profesionales en sus distintos niveles (grado y postgrado).

A las dos mujeres especialmente importantes en mi camino científico:

- A mi mamá, Marina, mi primera gran maestra en esta carrera, porque desde que era muy pequeña notaste mi inclinación por las ciencias naturales y me esperabas en tu laboratorio a la salida de la escuela con preparados en el microscopio para que pase horas mirando células. Eso que para mí era un aparente “juego” fue el motor que me motivó e impulsó a descubrir el asombroso mundo de lo microscópico y a encaminarme en esta carrera.
- A mi tía Ana, por ser mi ejemplo de vocación científica y valentía.

A mis queridos profesores de inglés, Julia Mariano y Roberto Meazzi, por sus valiosas enseñanzas las cuales me brindaron excelentes herramientas a la hora de escribir trabajos científicos o realizar presentaciones orales en congresos.

A mis amigas y amigos, por su apoyo constante, por escucharme, por estar presentes, compartir tantos momentos juntos y ser una dulce compañía en mi camino.

A Raquel, por su especial compañía en esta etapa.

Finalmente, a las personas que son pilares fundamentales de mi vida:

A Quintino, Marina, Chueco y Alcira, mis nonos, por transmitirme sabias e invaluable enseñanzas sobre la vida. Ellos ya no están físicamente pero están vivos en mi corazón y son mis grandes ejemplos de trabajo, fe, fortaleza, paciencia y resiliencia.

A Marina y Gustavo, mis padres, por ser mí sostén incondicional. Gracias por tanto cariño y amor. Gracias por enseñarme el valor de la vida y ser grandes ejemplos de nobleza. Gracias por estar a mi lado en cada paso de una manera muy especial: mamá, con su infinita ternura y papá, con su maravilloso optimismo que me impulsa a mirar la vida desde otra perspectiva y su dulce compañía en mis largas horas de estudio, leyendo a mi lado hasta terminar el día.

A Luján, mi hermana, por ser mi gran amiga, por alegrar todos mis días con sus graciosas ocurrencias, por mirarme y escucharme con el corazón, por cuidarme y ser mi refugio en momentos difíciles, por su nobleza y profundo amor.

A mi familia, esta tesis se la dedico a ustedes.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	12
RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN	19
ESTRÉS Y ADICCIÓN A DROGAS: MARCO TEÓRICO.....	20
NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA	25
Síntesis, almacenamiento, liberación, recaptación y degradación de dopamina	25
Receptores de dopamina.....	26
Cocaína: mecanismo de acción	27
Vías dopaminérgicas centrales	28
NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA.....	29
Síntesis, almacenamiento, liberación y recaptación de glutamina	30
Receptores glutamatergicos ionotrópicos y metabotrópicos	32
Intercambiador Cistina/Glutamato	35
Transportadores de glutamato	36
Glutamato en el Sistema Nervioso	38
CÉLULAS GLIALES	39
Astrocitos	39
Microglía	43
Marcadores fenotípicos.....	45
Activación de la microglía.....	46
CIRCUITO DE LA MOTIVACIÓN.....	50
Núcleo Accumbens: Organización estructural y funcional.	52
Participación del circuito de la motivación en los efectos estimulantes y de recompensa de las drogas de abuso.	54
SENSIBILIZACIÓN	54
Inducción y expresión de la sensibilización.	56
Sensibilización conductual.	56
Eventos moleculares y neuroquímicos asociados a la sensibilización a drogas: participación de la transmisión dopaminérgica y glutamatergica.	58
Impacto del estrés y la drogas de abuso sobre sustratos neurobiológicos comunes.....	59
Sensibilización y reforzamiento.	62
Sensibilización conductual y autoadministración de drogas.	62
HIPÓTESIS DE LA HOMEOSTASIS DE GLUTAMATO EN LA ADICCIÓN.....	64
Homeostasis de glutamato, estrés y adicción.	67
Modulación neuroinmune de la homeostasis de glutamato: influencia del estrés y las drogas de abuso.	70

Herramientas terapéuticas para restablecer la homeostasis de glutamato.	72
Minociclina, una droga prometedora para el tratamiento de neuropatologías.....	74
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	76
HIPÓTESIS	77
OBJETIVO GENERAL	77
OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Determinar la influencia de la exposición a estrés crónico sobre el efecto estimulante motor de cocaína y la liberación de dopamina en NAc core y shell.	78
OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Determinar la influencia de la exposición a estrés crónico en la homeostasis de glutamato en NAc core y shell.....	78
OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Evaluar la participación de la microglía en la expresión del fenómeno de sensibilización conductual a cocaína inducido por estrés crónico mediante un tratamiento sistémico con minociclina.	79
OBJETIVO ESPECÍFICO 4: Estudiar la influencia de la exposición a estrés crónico sobre la morfología y función de la microglía en NAc core.....	79
OBJETIVO ESPECÍFICO 5: Determinar la contribución de la microglía en la influencia de la exposición a estrés crónico sobre la expresión de GLT-1, la inmunoreactividad de GFAP y la concentración basal de glutamato extracelular en NAc core mediante su modulación con un tratamiento sistémico con minociclina.....	80
OBJETIVO ESPECÍFICO 6: Estudiar el rol de la microglía en la influencia de la exposición a estrés crónico sobre la morfología de espinas dendríticas en NAc core mediante su modulación con un tratamiento sistémico con minociclina.....	81
OBJETIVO ESPECÍFICO 7: Evaluar el efecto de un tratamiento sistémico con minociclina en la influencia facilitadora del estrés crónico sobre la autoadministración de cocaína.	82
MATERIALES Y MÉTODOS	83
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES.....	84
Animales.....	84
Drogas	84
Estrés crónico por restricción de movimiento	85
Tratamiento con minociclina.....	85
Modelo experimental de sensibilización cruzada a cocaína inducido por estrés.....	85
Modelo experimental de autoadministración de cocaína inducido por estrés	85
ESTUDIOS CONDUCTUALES.....	88
Registro de actividad locomotora.....	88
Autoadministración	88
ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS	93

Microdiálisis <i>in vivo</i>	93
Microdiálisis <i>in vivo</i> por el método de <i>no net flux</i>	96
Determinación de dopamina por HPLC	97
Determinación de glutamato por HPLC	97
Histología	98
ESTUDIOS MICROSCÓPICOS.....	99
Densidad y morfología de las espinas dendríticas.....	99
Inmunofluorescencia	101
ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	104
Cuantificación de GLT-1.....	104
Cuantificación de los niveles de ARNm de TNF- α e IL-1 β	106
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	108
RESULTADOS.....	109
1. Influencia de la exposición a estrés crónico sobre el efecto estimulante motor de cocaína y la liberación de dopamina en NAc core y shell.....	110
2. Influencia de la exposición a estrés crónico en la homeostasis de glutamato en NAc core y shell.....	114
3. Efecto de un tratamiento sistémico con minociclina sobre la sensibilización cruzada a cocaína inducida por estrés crónico.....	119
4. Efecto a largo plazo de la exposición a estrés crónico sobre la morfología y función de la microglía en NAc core: influencia de minociclina.....	121
5. Estudio de la participación de la microglía en los cambios inducidos por la exposición a estrés crónico sobre la homeostasis de glutamato en NAc core mediante un tratamiento sistémico con minociclina.....	128
6. Estudio de la participación de la microglía sobre los cambios en la morfología de espinas dendríticas inducidos por la exposición a estrés crónico empleando un tratamiento sistémico con minociclina.....	132
7. Influencia de un tratamiento sistémico con minociclina sobre la autoadministración de cocaína en animales previamente expuestos a estrés crónico.....	135
DISCUSIÓN	141
Potenciación de las propiedades estimulantes de cocaína sobre la actividad motora y liberación de dopamina en NAc core, pero no en shell, en un modelo de sensibilización cruzada inducida por estrés crónico.....	143
Relevancia de la desregulación de la homeostasis de glutamato en NAc core, pero no en shell, para la vulnerabilidad al desarrollo de abuso de cocaína luego de la exposición crónica a estrés.....	146

Contribución de la microglía y los astrocitos a la desregulación de la homeostasis de glutamato inducida por estrés crónico en NAc core.....	150
Rol de las células gliales en las neuroadaptaciones estructurales postsinápticas inducidas por la exposición a estrés crónico en NAc core	157
Estrés y vulnerabilidad a la adicción a cocaína: rol de proteínas gliales como reguladoras de la plasticidad estructural en NAc core.....	162
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167

ABREVIATURAS

ABP: Proteína de unión a actina
AC: Adenilato ciclasa
ADH: Alcohol deshidrogenasa
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADP: Adenosín difosfato
AHV: Ácido homovanílico
ALDH: Aldehído deshidrogenasa
AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
AMPc: AMP cíclico
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ARNt: ARN de transferencia
ATP: Adenosín trifosfato
ATV: Área Tegmental Ventral
BH4: Tetrahidrobiopterina
BHE: Barrera hematoencefálica
BLA: Amígdala basolateral
Cis: Cistina
CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
COMT: Catecol-O metil transferasa
CPfd: Corteza Prefrontal dorsal
CPfm: Corteza Prefrontal medial
CPfv: Corteza Prefrontal ventral
CPP: Preferencia condicionada a un sitio
CRF: Factor liberador de corticotrofina
DA: Dopamina, 3,4-dihidroxifenilalanina
DAG: diacilglicerol
DAT: Transportador de dopamina
DMSO: Dimetilsulfóxido
DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DOPAL: 3,4-dihidroxifenilacetaldehído
DOPET: 3,4-dihidroxifeniletanol
EAAT: Transportadores de aminoácido excitatorio
EPSCs: Corrientes postsinápticas excitatorias

FR1: Razón fija 1

GABA: Ácido γ amino butírico

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

Gln: Glutamina

GLT-1: Transportador Glutamatérgico

Glu: Glutamato

GSH: Glutati6n

HPLC-ECD: Cromatografía líquida de alta *performance* con detecci6n electroquímica

IFT: Intensidad de fluorescencia total

iGluR: Receptor ionotrópico de glutamato

i.p.: intraperitoneal

IP3: Inositol-1,4,5-trifosfato

KA: Kainato

LCR: Líquido cefalorraquídeo

L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina

LTP: Potenciación a largo plazo

LTD: Depresi6n a largo plazo

MAO: Monoamino oxidasa

MEC: Matriz extracelular

mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato

min: minuto/s

MMP: Metaloproteasas

MSN: Neuronas medianas espinosas

NAC: N-Acetilcisteína

NAc: Núcleo Accumbens

NMDA: N-metil-D-aspartato

PB: *Buffer* fosfato

PBS: *Buffer* fosfato salino

PFA: Paraformaldehído

PKC: Proteína quinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PR: Raz6n progresiva

PSD: Densidad Postsináptica

PV: Pálido Ventral

SLC: Familia de transportadores *solute carrier*

SNC: Sistema Nervioso Central

SNigra: Sustancia Nigra

TH: Tirosina hidroxilasa

TLR: Receptores tipo Toll

t-sp: transient synaptic plasticity

VGLUT: Transportador vesicular de glutamato

VMAT: Transportador vesicular de monoaminas

Xc⁻: Intercambiador Cis/Glu

xCT: Subunidad catalítica del intercambiador Cis/Glu

RESUMEN

La exposición a eventos estresantes a lo largo de la vida constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de diversas neuropatologías, incluida la adicción a drogas. Estudios en modelos experimentales de adicción han centrado su atención en la proyección glutamatérgica proveniente de Corteza Prefrontal (CPf) hacia Núcleo Accumbens (NAc), principal área de integración límbico-motora, ya que la misma ha sido críticamente implicada en la conducta de búsqueda de una amplia variedad de drogas de abuso.

La hipótesis glutamatérgica de la adicción establece un estrecho vínculo entre la alteración de la transmisión glutamatérgica y la función astrogliar en NAc. Sobre la base de esta hipótesis y teniendo en cuenta la influencia proactiva del estrés sobre el efecto de cocaína en la transmisión glutamatérgica, estudios de nuestro laboratorio reportaron una marcada y persistente desregulación de la homeostasis de glutamato en NAc core. Esta alteración homeostática fue propuesta como mecanismo neurobiológico que sustenta la potenciación del efecto estimulante motor y reforzante de cocaína en animales previamente expuestos a estrés.

Por otro lado, evidencias recientes postulan que la microglía, un tipo de célula glial que comprende el sistema inmune innato residente del cerebro, modula la transmisión glutamatérgica. Interesantemente, tanto el estrés como las drogas de abuso constituyen estímulos capaces de inducir cambios morfológicos y funcionales significativos en estas células.

En conjunto, estos hallazgos sientan las bases de que la transmisión glutamatérgica y la función glial forman parte de un mecanismo común susceptible de ser perturbado por la exposición a drogas de abuso y a experiencias estresantes, lo cual sugiere que las alteraciones biológicas inducidas por la exposición a estrés en el cerebro constituirían un escenario propicio para facilitar el desarrollo de conductas adictivas.

A la fecha no existe una intervención farmacológica eficaz para tratar la comorbilidad existente entre los desórdenes de estrés y del uso de sustancias psicoactivas. Por consiguiente, es importante, desde el punto de vista fisiopatológico, estudiar la base neurobiológica común de ambos trastornos, a fin de encontrar nuevos blancos terapéuticos para tratar esta comorbilidad. Más aún, se desconoce el rol jugado por la microglía en la homeostasis de glutamato en NAc core que media la vulnerabilidad a la adicción inducida por estrés.

Esta tesis se enfoca en el estudio del rol que desempeña la microglía en la desregulación de la homeostasis de glutamato en NAc core, en un modelo de estrés crónico que induce sensibilización a los efectos estimulantes de cocaína y facilitación de la conducta de autoadministración de la droga, mediante el empleo de un tratamiento farmacológico sistémico con minociclina, un potente inhibidor de la activación de la microglía cuyo efecto neuroprotector ha sido atribuido a sus propiedades anti-inflamatorias.

Para ello, los animales fueron sometidos a un protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento durante una semana (2 h/día) y dos semanas después del último episodio de

estrés (día 21) evaluamos: 1) la expresión de la sensibilización conductual a cocaína (15 mg/Kg, intraperitoneal: i.p.), 2) la liberación sináptica de glutamato y dopamina inducida por cocaína mediante la técnica de microdiálisis *in vivo* en NAc core y shell, 3) la influencia de un tratamiento sistémico con minociclina (30 mg/Kg cada 12 h, i.p.) en aspectos morfológicos y funcionales de la microglía, la concentración basal de glutamato extracelular por el método de *no net flux*, la expresión del transportador de glutamato GLT-1 por *western blot*, la inmunoreactividad de GFAP (marcador de astocitos) y la plasticidad estructural postsináptica en NAc core; la expresión de la sensibilización cruzada conductual a cocaína y la facilitación de la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína.

En primer lugar, los resultados obtenidos en este estudio demostraron que, tres semanas después del primer episodio de estrés crónico, la administración no contingente de una dosis aguda de cocaína fue suficiente para poner en evidencia el fenómeno de sensibilización cruzada al efecto estimulante motor de cocaína. Esta alteración conductual fue evidenciada en paralelo a la sensibilización dopaminérgica observada en NAc core, pero no en shell, en animales previamente expuestos a estrés, lo que nos permitió validar el modelo de sensibilización cruzada entre estrés crónico y cocaína.

Además, se evidenció una robusta atenuación de la liberación sináptica de glutamato en NAc core, pero no en shell, en respuesta a una inyección i.p. de cocaína dos semanas después del último episodio de estrés. Dicha alteración neuroquímica fue asociada a una diferencia observada en los niveles de glutamato extracelular de la línea de base experimental. Por otro lado, este efecto no fue evidenciado en NAc shell, lo que demostró una contribución diferencial entre ambos compartimentos de NAc y destacó el rol clave que desempeña NAc core a largo plazo en el fenómeno de sensibilización.

El sello distintivo de la desregulación de la homeostasis de glutamato observada en NAc core fue el aumento de la concentración basal de glutamato extracelular, el cual fue atribuido a una reducida expresión del transportador de glutamato, GLT-1, principalmente expresado en astrocitos. Consistentemente, se observó una reducida actividad astrogliar, evidenciada por la disminución de la inmunoreactividad de GFAP. Consecuente a esta desregulación homeostática, se evidenció una importante remodelación estructural postsináptica en la misma región cerebral al día 21 del protocolo experimental, la cual consistió en un incremento en la densidad total de espinas dendríticas y de espinas tipo *mushroom* en los animales previamente estresados.

En segundo lugar, se observaron persistentes cambios morfológicos y funcionales en la microglía en NAc core inducidos por la exposición a estrés crónico. Estas alteraciones se caracterizaron por un aumento de la complejidad y extensión de los procesos microgliales con un perfil característico de hiper-ramificación sin alteración del número de ramificaciones primarias, un incremento de la inmunoreactividad de Iba-1, un aumento de los niveles de

expresión de ARNm que codifica para TNF- α , en paralelo a una marcada tendencia de aumento de ARNm que codifica para IL-1 β y un aumento del número de células Iba-1 positivas. Estos cambios fueron asociados a la alteración, previamente descrita, de los mecanismos glutamatérgicos que subyacen la comorbilidad entre los trastornos de estrés y uso de sustancias psicoactivas ya que; al restablecer los niveles de glutamato basal a través de la normalización de la expresión de GLT-1 y de la actividad astrogliar, y restaurar los cambios plásticos estructurales postsinápticos mediante un tratamiento sistémico con minociclina, se suprimió la capacidad del estrés para facilitar la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína y potenciar la actividad psicomotora luego de una inyección no contingente de cocaína. Importantemente, este efecto preventivo de minociclina fue atribuido a su capacidad para restaurar la morfología y función de la microglía y su acción como inhibidor selectivo de la polarización microglial hacia el estado proinflamatorio.

Los resultados aquí presentados son altamente consistentes y se correlacionan con los resultados previos del laboratorio. Importantemente, estos hallazgos sugieren que los cambios en la función microglial inducidos por la exposición a estrés ejercen un rol adaptativo en el establecimiento y mantenimiento a largo plazo de alteraciones pre y postsinápticas en la transmisión glutamatérgica y alteraciones funcionales en los astrocitos, los cuales predisponen al desarrollo de la adicción. Más aún, este estudio propone a la minociclina como un potencial candidato para el tratamiento de la comorbilidad entre los desordenes de estrés y el abuso de cocaína.

Finalmente, nuestros resultados sientan las bases de un potencial mecanismo neurobiológico en NAc core que sería el responsable de la vulnerabilidad a la adicción inducida por estrés. La alteración de los niveles basales de glutamato extracelular desencadenada a partir del deterioro de la recaptación de este neurotransmisor, a expensas de la disminución de GLT-1, constituye una adaptación compartida inducida tanto por la exposición a estrés como por la administración repetida de drogas de abuso. En este contexto, la disminuída expresión de GLT-1, mediada por TNF- α liberado por la microglía activada tras la exposición repetida a estrés, en combinación con el consecuente impacto de los niveles incrementados de glutamato basal extracelular y TNF- α en la señalización postsináptica, proporciona no sólo las bases de un mecanismo fisiopatológico clave para promover cambios neuroadaptativos postsinápticos que conduzcan al desarrollo de conductas adictivas, sino que abre nuevos caminos para futuros estudios sobre la temática de la adicción a drogas inducida por la exposición a estrés.

INTRODUCCIÓN

ESTRÉS Y ADICCIÓN A DROGAS: MARCO TEÓRICO

La adicción a drogas se define como un trastorno crónico y recurrente caracterizado por la búsqueda y el consumo compulsivo de la droga a pesar de sus consecuencias negativas, la pérdida de control para limitar el consumo y la aparición de un estado emocional negativo frente a un impedimento de acceso a la misma, lo que refleja la presencia del síndrome de abstinencia a la droga (Koob y Le Moal, 1997; Koob y Volkow, 2010). Así, la adicción es considerada el punto final de una serie de transiciones desde el consumo inicial voluntario y controlado de la droga hasta la pérdida progresiva del control sobre el consumo y la emergencia de la conducta de búsqueda compulsiva de la droga que caracterizan el proceso adictivo; y la recaída al consumo, incluso después de un periodo de abstinencia prolongado, que constituye el sello distintivo de este trastorno (Belin y col., 2013; Everitt y Robbins, 2005; Robbins y Everitt, 1999).

Esta severa neuropatología constituye un importante problema de salud en numerosos países del mundo, la cual no sólo genera un importante deterioro en la salud de la persona que la padece sino que acarrea innumerables repercusiones en el ámbito social, económico y legal a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la adicción afecta entre el 3,4 y el 6,6% de la población mundial (*World Drug Report* -UNODC, 2017). Se estima que el número de personas que consumen drogas en la actualidad ha aumentado en un 30% con respecto al año 2009 y el 0,4% de las muertes anuales a nivel mundial se deben al abuso de drogas tales como cannabis, cocaína, opiáceos y anfetaminas entre las más frecuentemente consumidas (*World Drug Report* -UNODC, 2017). Según reportes actuales del Informe Mundial sobre Drogas (*World Drug Report* -UNODC) y SEDRONAR (Argentina) publicados en 2019 y 2017, respectivamente; en el año 2017, el 1,5% de la población Argentina (el 2,4% de los hombres y el 0,7 % de las mujeres) de entre 12 y 65 años había consumido cocaína en el último año. La prevalencia más alta de consumo de cocaína en el último año (3%) se registró entre los jóvenes de 18 a 24 años y, en menor medida, en los adultos de 25 a 49 años. Se estima que en la Argentina el consumo de cocaína aumentó casi el doble en el período 2010-2017 entre los adultos de 35 a 49 años de edad. Este panorama a nivel nacional y mundial subraya la necesidad de promover respuestas integrales en materia de salud sobre la base de la comprensión de la neurobiología de la adicción a las drogas.

En el campo de la neurociencia de la adicción se ha demostrado que a pesar del gran número de personas que prueban o consumen drogas durante períodos de tiempo variables, sólo entre un 10 y un 15% desarrolla adicción (O'Brien y col., 1986), lo que motiva a pensar que este trastorno se desencadena en individuos particularmente vulnerables. Teniendo en cuenta este contexto y a fin de explicar la transición del uso ocasional de drogas hacia la adicción y los

factores de vulnerabilidad que predisponen a este desorden, se han propuesto principalmente dos enfoques teóricos definidos por el estudio de la adicción centrado en la droga o en el individuo.

Por un lado, el estudio de la adicción centrado en la droga considera que el trastorno en el uso de sustancias psicoactivas es una patología que resulta de los cambios inducidos en la función cerebral por el consumo crónico de las mismas. Así, la relevancia de este enfoque radica en que el estudio focaliza su atención en los sustratos neurales y mecanismos neurobiológicos que subyacen a los fenómenos de tolerancia, dependencia, sensibilización, condicionamiento y abstinencia responsables de la transición del uso al abuso de drogas (Nestler, 1992; Robinson y Berridge, 1993; White, 1996).

Sobre la base de este enfoque, numerosos estudios en modelos animales postulan que la transición hacia la adicción estaría mediada por el desarrollo de una cascada de eventos moleculares que resultan en cambios neuroadaptativos duraderos en estructuras cerebrales que comprenden el circuito mesocorticolímbico en respuesta a la exposición repetida a drogas de abuso (Nestler, 2001). Dichas neuroadaptaciones constituirían la base neurobiológica no sólo de la vulnerabilidad al desarrollo de la adicción inducida por drogas sino también del mantenimiento de este trastorno conductual y de la recaída al consumo luego de largos períodos de abstinencia (Nestler y col., 1997; Nestler, 2001; White y Kalivas, 1998). Sin embargo, aunque este enfoque brinda un importante marco teórico basado en las alteraciones neurobiológicas y conductuales inducidas por la exposición a drogas, considera a las diferencias intra- e inter-individuales en el desarrollo de la adicción como artefactos del protocolo de investigación.

Por otro lado, el enfoque centrado en el individuo direcciona la atención hacia las variaciones individuales y considera que la adicción se desarrolla en ciertos individuos cuyas características biológicas desencadenan una respuesta patológica frente a la administración de drogas (Piazza y Le Moal, 1996). Este enfoque destaca la importancia de que el estado biológico de un individuo en conjunto con la exposición a factores ambientales juegan un rol clave en la vulnerabilidad al desarrollo de la adicción y en la recaída al consumo, ya que considera que ambos factores constituyen una importante base tanto de la etiología como de la patogenia de la adicción (Deminere y col., 1989; Piazza y Le Moal, 1998). En este contexto, la investigación centrada en la influencia del estrés en el consumo de drogas, por su impacto en el estado biológico, forma parte del estudio de la adicción centrado en el individuo.

En apoyo a este enfoque, estudios en modelos animales han demostrado una significativa diferencia inter-individual en el desarrollo de la conducta de autoadministración a psicoestimulantes, una particular vulnerabilidad al consumo y búsqueda de la droga dentro de una cepa animal y entre diferentes cepas, y una correlación positiva entre la conducta del animal

y la cantidad de droga administrada durante la fase de adquisición de la conducta (Piazza y col., 1989). Sumado a estas evidencias, otros estudios *in vivo* han reportado que la exposición a una gran variedad de estímulos estresantes tales como el pinchazo repetido de la cola del animal, el *shock* eléctrico en las patas, la deprivación de comida, la exposición a estrés por derrota social y estrés prenatal, la restricción de movimiento y el aislamiento social facilitan la adquisición de la conducta de autoadministración de drogas de manera dependiente al tipo de estímulo, la duración e intensidad del mismo (Piazza y col., 1990; Piazza y Le Moal, 1998).

En relación a este enfoque, múltiples estudios preclínicos, clínicos y epidemiológicos han propuesto que el desarrollo de adicción está fuertemente influenciado tanto por la constitución genética y el estado psicológico individual como por el contexto social en el cual ocurre la exposición a la droga (Kreek y col., 2005; Müller y col., 2010; Sinha, 2009; Sinha y col., 2006; Swendsen y col., 2010). En apoyo a estas evidencias, numerosos estudios evidenciaron una mayor prevalencia al consumo de drogas en individuos que experimentaron situaciones estresantes a lo largo de sus vidas (Boden y col., 2012; Clark y col., 2001; Montoya y col., 2003; Ouimette y col., 2007; Seal y col., 2007, 2009; Tuerk y col., 2009; Ullman y col., 2013). Más aún, el hecho de que la vulnerabilidad a la recaída en individuos adictos pueda persistir después de años de abstinencia implica que la adicción es causada no sólo por cambios duraderos en la función cerebral como resultado del uso repetido de la droga, sino también por el patrón genético individual y las asociaciones establecidas entre el ambiente y la administración de la droga (Kalivas y Volkow, 2005). Incluso, recientemente se ha publicado que las experiencias de vida son capaces de moldear el panorama epigenético del cerebro y, por lo tanto, pueden contribuir a la vulnerabilidad de un individuo al desarrollo de adicción. Tal es así que son capaces de potenciar las alteraciones inducidas por las drogas en la expresión genética de moléculas involucradas en los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la transición del uso de drogas a la adicción (Nestler y Lüscher, 2019).

Todas estas evidencias apoyan la idea de que el trastorno en el uso de sustancias psicoactivas no es simplemente un desorden iatrogénico inducido por la ingestión crónica de drogas, sino que las características fenotípicas del individuo y los factores ambientales desempeñan un papel importante en la determinación del desarrollo de esta conducta adaptativa patológica (Piazza y Le Moal, 1996). De esta manera, se ha propuesto como hipótesis central de la adicción que la exposición a una amplia variedad de estímulos ambientales, interactuando con las bases genéticas propias del individuo, determinan la respuesta inicial frente a los primeros encuentros del individuo con la droga, mientras que las neuroadaptaciones cerebrales que resultan de la exposición repetida a la droga en conjunto con dichos factores genéticos y ambientales juegan un rol clave en el desarrollo de la adicción (Kalivas y Volkow, 2005; Koob y Volkow, 2010; Nestler, 2004). De este modo, podemos considerar a la adicción a drogas como

un desorden multifactorial en el que variables genéticas, ambientales y las experiencias previas del individuo, como el consumo de drogas o la exposición a eventos estresantes, interactúan modulando la respuesta del individuo frente a las drogas e incrementando la vulnerabilidad al desarrollo de adicción.

A la fecha no existe un tratamiento farmacológico eficaz para la adicción y menos aún para la comorbilidad entre los trastornos de estrés y los desórdenes en el uso de sustancias psicoactivas. Por lo tanto, es sumamente importante, desde el punto de vista fisiopatológico, estudiar y comprender las bases neurobiológicas comunes de los efectos del estrés crónico y las drogas de abuso, a fin de encontrar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la comorbilidad entre ambos trastornos o incluso la prevención del potencial desarrollo de adicción en pacientes que padecen trastornos de estrés.

En el contexto de la investigación científica préclínica, los modelos de estrés se basan principalmente en la exposición forzada a estímulos o situaciones que normalmente son evitadas por el sujeto experimental (Lu y col., 2003; Piazza y Le Moal, 1998). Los estudios sobre la base biológica de los efectos del estrés en la autoadministración de drogas han sido dirigidos por dos principales estrategias de investigación complementarias.

Por un lado, una estrategia de investigación se ha centrado en las respuestas biológicas del estrés en la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) y la secreción de glucocorticoides proporcionando las bases neuroendocrinas de la influencia del estrés en los efectos reforzantes de las drogas (McEwen y col., 1986; De Kloet, 1992).

Por otro lado, la estrategia de otros laboratorios se ha enfocado en los cambios inducidos por el estrés en la actividad de los sustratos neurobiológicos que median los efectos reforzantes de las drogas, siendo la hipótesis subyacente que las experiencias estresantes facilitan la autoadministración de drogas al aumentar la actividad de estos circuitos cerebrales. Esta investigación se ha centrado principalmente en el estudio de la proyección mesencefálica dopaminérgica al Núcleo Accumbens (NAc), la cual se considera uno de los principales sustratos neurales que media los efectos reforzantes de las drogas de abuso (Koob y Bloom, 1988; Nestler, 1992; Robinson y Berridge, 1993; Wise, 1996).

Sobre la base de esta última estrategia, estudios en modelos animales enfocados en la influencia del estrés en el desarrollo de adicción han centrado la atención en el circuito mesocorticolímbico, particularmente en la inducción de cambios neuroadaptativos en la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica. Se ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, que proyectan desde Área Tegmental Ventral (ATV) hacia NAc y regiones corticales, parecen ser los sustratos neurobiológicos donde hormonas como el factor liberador de corticotrofina (CRF) y los glucocorticoides, liberadas durante eventos estresantes, ejercen su acción aumentando la actividad de la transmisión dopaminérgica (Kalivas

y Stewart, 1991, Piazza y Le Moal, 1998). La activación de dicha vía neural media los efectos reforzantes de las drogas de abuso (Berridge y Robinson, 1998) y, por lo tanto, alteraciones inducidas por estrés en este circuito han sido asociadas a la facilitación de la conducta de autoadministración de drogas de abuso (Piazza y Le Moal, 1998; Koob y Bloom, 1988; Wise, 1996). De este modo, se ha propuesto que tanto el estrés como las drogas de abuso impactan sobre sustratos neuronales comunes, lo que destaca al estrés como un importante factor de vulnerabilidad para el desarrollo de adicción.

Interesantemente, evidencias de nuestro y otros laboratorios han propuesto que el incremento de la actividad dopaminérgica en NAc que subyace a la interacción entre estrés y drogas es un mecanismo dependiente de la actividad de la neurotransmisión glutamatérgica (García-Keller y col., 2013, Pacchioni y col., 2007; Wang y col., 2005). Más aún, una desregulación de la homeostasis de glutamato fue observada en respuesta a una sesión de estrés y propuesta como evento clave que subyace a la facilitación de la conducta de autoadministración de cocaína inducida por estrés agudo (García-Keller y col., 2016). Esta alteración homeostática recapitula lo observado frente a la administración crónica de drogas y manifiesta el rol jugado por la glía en la regulación de los mecanismos glutamatérgicos en NAc (Kalivas, 2009).

Más específicamente, a nivel molecular, se ha demostrado que la activación de los sistemas glutamatérgicos y dopaminérgicos, tras la exposición a una amplia variedad de estímulos estresantes y la administración repetida de drogas, afecta vías de señalización intracelulares específicas que promueven la alteración en la expresión de genes dentro del circuito de la motivación. La alteración en el patrón de expresión de genes es responsable de las alteraciones neuroquímicas y moleculares que constituyen lo que se conoce como sensibilización neural, la cual se traduce en alteraciones conductuales tal como el fenómeno de sensibilización psicomotora (Robinson y Berridge, 1993, 2001). Dicho fenómeno ha sido estrechamente vinculado a la autoadministración de drogas y otras conductas adictivas (Marinelli y col., 1998; Robinson y Berridge, 2001).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y las evidencias previas de nuestro laboratorio, es importante destacar que esta tesis se desenvuelve en el marco de un enfoque centrado en el individuo y sobre la base del concepto de sensibilización, focalizando la atención en el estudio del efecto proactivo del estrés sobre los mecanismos neurobiológicos en NAc que subyacen a la sensibilización conductual a cocaína y la facilitación de la conducta de autoadministración de este psicoestimulante.

NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA

Síntesis, almacenamiento, liberación, recaptación y degradación de dopamina

La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central (SNC). El precursor metabólico de esta monoamina es el aminoácido L-tirosina, un aminoácido aromático captado por las neuronas que sintetizan catecolaminas. La tirosina hidroxilasa (TH), una enzima citosólica, es la encargada de transformar este aminoácido en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), siendo éste el paso limitante de la velocidad de síntesis de las catecolaminas (Nagatsu y col., 1964; Levitt y col., 1965). Luego, por acción de la enzima citosólica decarboxilasa de aminoácidos aromáticos (DOPA-decarboxilasa), L-DOPA es transformada en dopamina.

En la neurona, la actividad de la enzima TH está regulada por el producto final de la vía biosintética, es decir por los niveles de catecolaminas presentes, por la disponibilidad del cofactor enzimático tetrahidrobiopterina (BH₄) y por la activación de los receptores presinápticos D₂. Una vez sintetizada, la dopamina es incorporada a las vesículas a través de un transportador de alta afinidad denominado transportador vesicular de monoaminas (VMAT₂). Este transportador funciona acoplado a una bomba de protones dependiente de la hidrólisis de ATP (Nelson, 1998). De esta manera, el gradiente protónico transvesicular funciona como fuerza impulsora para el almacenamiento de dopamina (Liu y Edwards, 1997). Ante la llegada de un potencial de acción al terminal presináptico, la despolarización de la membrana favorece la apertura de canales de calcio voltaje dependientes y la entrada de iones Ca²⁺ promueve la fusión de las vesículas con la membrana sináptica, provocando la descarga del neurotransmisor al espacio sináptico.

Una vez liberada al espacio extracelular, la dopamina debe ser removida de la hendidura sináptica para detener su señalización. Este neurotransmisor puede ser captado por neuronas dopaminérgicas o células gliales, mecanismo que precede a su degradación metabólica o reutilización por almacenamiento en vesículas.

El transportador de dopamina (DAT) pertenece a la familia de los transportadores de monoaminas y se encuentra presente en la neurona presináptica. Posee un rol fisiológico clave en la inactivación y reciclado de la dopamina liberada en la hendidura sináptica a través del transporte activo del neurotransmisor desde la hendidura sináptica hacia la neurona presináptica utilizando energía de un gradiente iónico de Na⁺/Cl⁻ (Kahlig y Galli, 2003; Nelson, 1998). Con respecto a la estequiometría de intercambio, la dopamina es cotransportada al interior del terminal presináptico con 2 iones de Na⁺ y un ion Cl⁻ (Attwell y Mobbs, 1994). Cambios en este gradiente o en la función del transportador alteran el mecanismo de recaptación

produciendo efectos notables a nivel postsináptico. La recaptación neuronal por el DAT es seguida por el almacenamiento en vesículas sinápticas mediante el VMAT2, para su reutilización.

La dopamina que se acumula en el citosol es degradada por la monoamino oxidasa (MAO). La deaminación oxidativa por MAO produce peróxido de hidrógeno y 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL). Este aldehído puede ser inactivado ya sea por reducción al alcohol 3,4-dihidroxifeniletanol (DOPET) correspondiente o por una mayor oxidación al ácido carboxílico 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) por la alcohol deshidrogenasa (ADH) o la aldehído deshidrogenasa (ALDH) respectivamente. En condiciones normales, DOPAL se oxida predominantemente al ácido carboxílico correspondiente.

Por otro lado, la dopamina también es degradada por la catecol-O metil transferasa (COMT). La COMT transfiere grupos metilo de la S-adenosilmetionina a grupos hidroxilo de varios compuestos que poseen grupo catecol. La 3-O-metilación de la DOPAC por la COMT conduce al ácido homovanílico (AHV), uno de los principales productos de degradación de la dopamina.

La liberación presináptica de dopamina está modulada por receptores presinápticos D2 mediante un mecanismo de retroalimentación autoinhibitorio, el cual representa un importante proceso de control fisiológico de la actividad de la transmisión dopaminérgica (Starke y col., 1989).

Receptores de dopamina

La dopamina activa a dos familias de receptores transmembranosos acoplados a proteínas G, denominados receptores dopaminérgicos del grupo D1 compuesto por los subtipos de receptores D1 y D5, y receptores dopaminérgicos del grupo D2 compuesto por los subtipos D2, D3 y D4 (Jaber y col., 1996; Seeman y van Tol, 1994).

Los receptores D1 y D2 son los más abundantes en el cuerpo estriado dorsal y ventral, tálamo e hipotálamo. Los D2 también se localizan en hipófisis. Los receptores D1 están acoplados a proteína excitatoria (G_s) y tras su activación por la unión de dopamina, se produce una estimulación de enzima adenilato ciclasa (AC) generando el incremento en los niveles de AMP cíclico (AMPc) intracelular. Estos receptores tienen localización postsináptica y en gran medida sobre las neuronas medianas espinosas (D1-MSNs) GABAérgicas. En contraste, los receptores D2 se acoplan a proteína G inhibitoria (G_i o G_o) y tras la unión de dopamina inhiben la actividad de la enzima AC, provocando la inhibición de la formación de AMPc y conduciendo a la apertura de canales de potasio que provoca hiperpolarización de la membrana celular, inactivación de canales de calcio dependientes de voltaje y estimulación de la enzima

fosfolipasa C (PLC). Existen a su vez dos variantes de estos receptores denominados $D2_s$, que se encuentran a nivel presináptico sobre la neurona dopaminérgica funcionando como autoreceptores que regulan la liberación de dopamina, y $D2_l$ que se ubican postsinápticamente, particularmente sobre terminales glutamatérgicos y en gran medida sobre las neuronas GABAérgicas D2-MSNs.

Cocaína: mecanismo de acción

La cocaína o benzoilmetilecgonina es un alcaloide natural que se extrae de las hojas de la planta de coca (*Erythroxylon coca*). Este psicoestimulante es un potente inhibidor de la recaptación de monoaminas (principalmente dopamina) liberadas por exocitosis desde el terminal presináptico, ya que bloquea los transportadores de monoaminas (DAT, NET y SERT), en mayor medida DAT, dificultando su reingreso al terminal presináptico y produciendo un aumento en las concentraciones de monoaminas extracelulares (dopamina, noradrenalina, serotonina) (Ritz y col., 1987). De esta manera, al aumentar la disponibilidad de estos neurotransmisores dentro de la hendidura sináptica, la actividad de la transmisión dopaminérgica, noradrenérgica, serotoninérgica incrementa considerablemente, ya que al no ser recaptados los neurotransmisores continúan estimulando a la neurona postsináptica al unirse con sus receptores específicos (Figura 1).

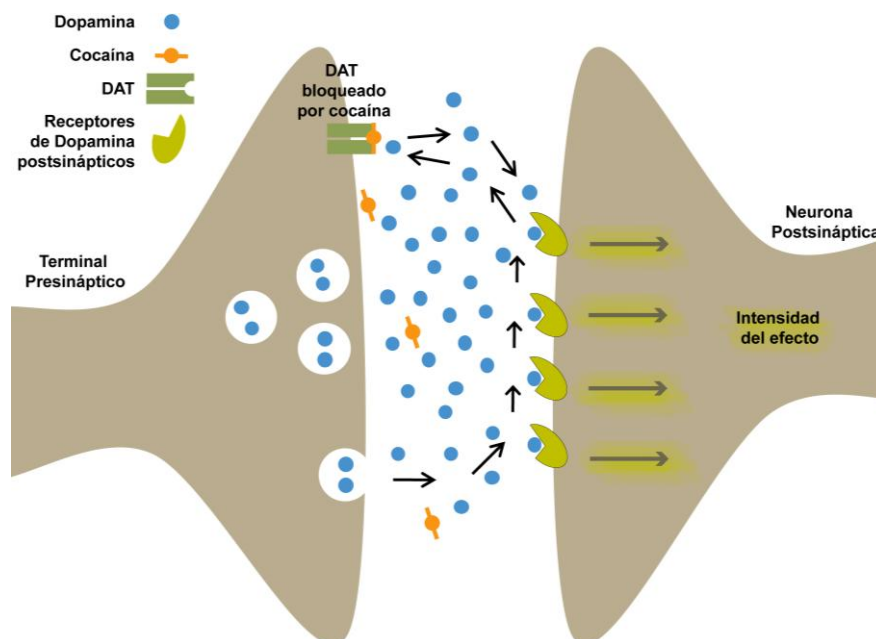


Figura 1. Mecanismo de acción de cocaína. Bloqueo del transportador de dopamina (DAT) presente en el terminal dopaminérgico y estimulación de la neurona postsináptica al aumentar la disponibilidad de dopamina dentro de la hendidura sináptica.

La cocaína se comporta como una amina simpáticomimética ya que es capaz de mimetizar las acciones de las catecolaminas. El rol crucial del DAT en el mecanismo de acción de cocaína fue evidenciado mediante estudios realizados con ratones genéticamente deficientes en este transportador, los cuales demostraron que la administración de cocaína no produce efectos conductuales ni bioquímicos. Estos estudios sugirieron que el DAT es necesario para la acción farmacológica de la cocaína ya que al bloquearlo, uniéndose de manera específica y con gran afinidad, inhibe la recaptación de dopamina.

Además, se ha reportado que los psicoestimulantes, como la cocaína, disminuyen la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas a través de la autoinhibición mediada por el receptor dopaminérgico D2 localizado en el terminal presináptico (Chen y Reith, 1994). Sin embargo, el bloqueo de la recaptación de dopamina supera la consecuente reducción en la frecuencia de disparo de las células dopaminérgicas, resultando netamente en un incremento en los niveles extracelulares de dopamina. Este incremento de dopamina en la hendidura sináptica genera un marcado efecto estimulante que se traduce en euforia, aumento del estado de alerta y vigilia y actividad motora en conjunto con una marcada estimulación del sistema nervioso autónomo simpático.

Vías dopaminérgicas centrales

Las neuronas dopaminérgicas centrales están organizadas en tres sistemas principales (Cooper y col., 1996), tal como lo muestra la figura 2.

La vía nigroestriatal, responsable de alrededor del 75% de toda la dopamina del encéfalo, está compuesta por los cuerpos celulares de la Sustancia Nigra (SNigra) cuyos axones proyectan al Cuerpo Estriado dorsal a través del haz prosencefálico medial y cuya principal función es el control motor (Swerdlow y col., 1986).

La vía mesocorticolímbica, cuyos cuerpos celulares se originan en el mesencéfalo, particularmente en ATV, proyecta sus fibras por el haz prosencefálico medial y luego se divide conformando la vía mesocortical y la vía mesolímbica. La vía mesocortical proyecta hacia Corteza Prefrontal (CPf), Corteza Cingulata y Corteza Entorrinal, mientras que la vía mesolímbica proyecta rostralmente hacia NAc, Tubérculo Olfatorio, Corteza Piriforme, Amígdala e Hipotálamo lateral (Le Moal y Simon, 1991) y cuya principal función es el control de las emociones, procesos cognitivos, motivación y recompensa (Koob y col., 1994). A su vez, CPf, Amígdala, Tálamo dorsomedial e Hipocampo envían proyecciones al NAc, y éste a su vez a ATV y al Núcleo Ventral Pálido.

El sistema tuberohipofisario, sistema neuroendócrino constituido por neuronas cortas localizadas en el Núcleo Arcuato del Hipotálamo (porción ventral del Hipotálamo). Estas

neuronas que se dirigen a la Eminencia Media y la Hipófisis regulan algunas secreciones hormonales como la inhibición de la síntesis y liberación de prolactina y estimulación de la liberación de la hormona de crecimiento.

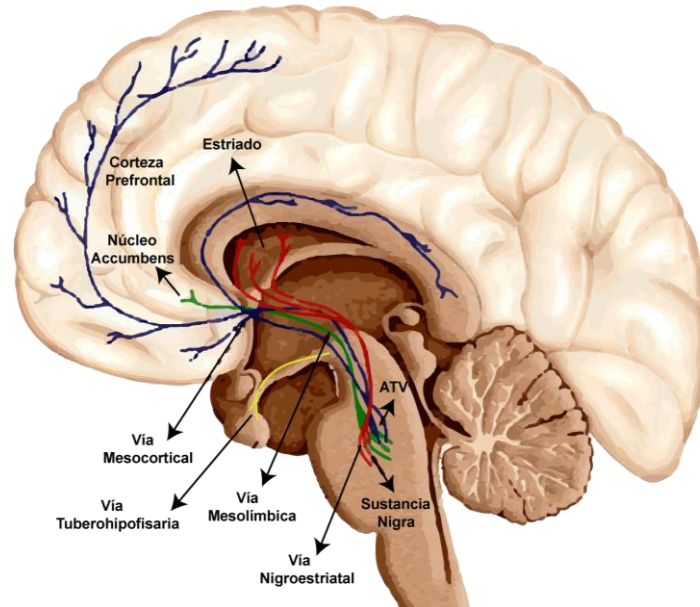


Figura 2. Vía dopaminérgica nigroestriatal (en color rojo). Vía dopaminérgica mesocortical (en color azul). Vía dopaminérgica mesolímbica (en color verde). Vía dopaminérgica tuberohipofisaria (en color amarillo).

NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

El aminoácido L-glutamato es considerado el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, sistema en el que se distribuye de manera ubicua (Cotman y col., 1995). Este neurotransmisor está involucrado principalmente en procesos de memoria y aprendizaje ya que media los mecanismos de potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) que subyacen a ambos procesos cognitivos y ejerce un importante rol en diversos procesos fisiológicos tales como la formación, remodelación y eliminación de sinapsis, migración neuronal, muerte neuronal y refinamiento de las conexiones neurales (Collingridge y Lester, 1989; Fonnum, 1984; Headley y Grillner, 1990; Ottersen y Storm-Mathisen, 1984). Además, se ha demostrado que el glutamato ejerce acción en órganos periféricos (Hinoi y col., 2004). Interesantemente, ha sido propuesto como inmunotransmisor por su acción sobre receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluRs) y metabotrópicos (mGluRs) expresados tanto en células del SNC como en células del sistema inmune (Boldyrev y col., 2005).

Por otro lado, la mayoría de las neuronas y las células gliales, expresan receptores glutamatérgicos en sus membranas (Hösli y Hösli, 1993; Kettenmann y col., 2011; Liu y col.,

2016; Murugan y col., 2013; Steinhauser y Gallo, 1996). Incluso, las células gliales son capaces de liberar glutamato al espacio extracelular por diversos mecanismos, siendo uno de los más frecuente la liberación no vesicular (Kettenmann y col., 2011; Malarkey y Parpura, 2008). Así, no sólo las neuronas liberan y recaptan glutamato sino también las células gliales, lo que vuelve extremadamente compleja la regulación de los mecanismos glutamatérgicos. Estos mecanismos están estrictamente regulados a nivel fisiológico y dado que la distribución de este neurotransmisor está altamente compartimentalizada, su concentración varía drásticamente dependiendo del compartimento biológico que se analice (Moussawi y col., 2011a).

La concentración media de glutamato en el cerebro, monitoreada a través de la técnica de microdiálisis, es de 10 mM (Kvamme y col., 1985) mientras que en el líquido extracelular es de 2-9 μ M (Baker y col., 2003).

La desregulación de los mecanismos glutamatérgicos ha sido implicada en la etiología y patogenia de enfermedades del SNC, incluyendo isquemia (Lipton, 1999, Small y col., 1999), esclerosis lateral amiotrófica (Díaz-Amarilla y col., 2011; Rothstein y col., 1995a,b), Alzheimer (Honig y col., 2000), epilepsia y esquizofrenia (Javitt y col., 2004; Meldrum, 1994), trastornos del espectro autista (Santoro y col., 2012), dolor neuropático crónico (Milligan y Watkins, 2009), depresión (Niciu y col., 2014) y el desarrollo de adicción a drogas (Kalivas, 2009).

Síntesis, almacenamiento, liberación y recaptación de glutamato

En el cerebro, el glutamato es sintetizado en las terminales presinápticas a partir de la glucosa y a través del ciclo de los ácidos carboxílicos (ciclo de Krebs) por la conversión de α -oxoglutarato en glutamato bajo la acción de aminotransferasas, o de la glutamina (Gln) sintetizada en los astrocitos que es liberada al espacio extracelular y transportada al interior de las terminales neuronales donde es convertida en glutamato por la enzima mitocondrial glutaminasa (Albrecht y col., 2010). El ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas ha sido propuesto como la mayor vía por la cual el glutamato es reciclado.

Una vez en el terminal nervioso, el glutamato es almacenado en vesículas por el transportador vesicular (VGLUT), una proteína multimérica compleja que funciona mediante gradiente de protones (Albrecht y col., 2010; Takamori, 2006).

Cuando llega el impulso nervioso al terminal neuronal, el glutamato presente en las vesículas es liberado a la hendidura sináptica por un mecanismo dependiente de iones Ca^{2+} conocido como liberación vesicular. El glutamato liberado ejerce su acción al unirse a los receptores glutamatérgicos presinápticos, postsinápticos y perisinápticos. Este neurotransmisor también es liberado mediante un mecanismo no vesicular, a través del intercambiador Cistina/Glutamato (Cis/Glu) por las células gliales, principalmente astrocitos (Kettenmann y

col., 2011; Malarkey y Parpura, 2008). Una vez liberado al espacio extracelular, la acción del glutamato se interrumpe por recaptación mediada por transportadores glutamatérgicos presentes, principalmente, en la membrana del terminal presináptico y las células gliales (Danbolt, 2001; Kettenmann y col., 2011; Seal y Amara, 1999) (Figura 3).

Con respecto a la glutamina, ésta se encuentra normalmente presente en el líquido extracelular a una concentración alrededor de 200-500 μM (Gjessing y col., 1972; Hamberger y Nystrom, 1984). Sin embargo, no genera excitotoxicidad como el glutamato a elevadas concentraciones ya que no es capaz de activar los receptores glutamatérgicos y actúa, por tanto, como transmisor de reserva inactivo sometido al control regulador de los astrocitos (Danbolt, 2001).

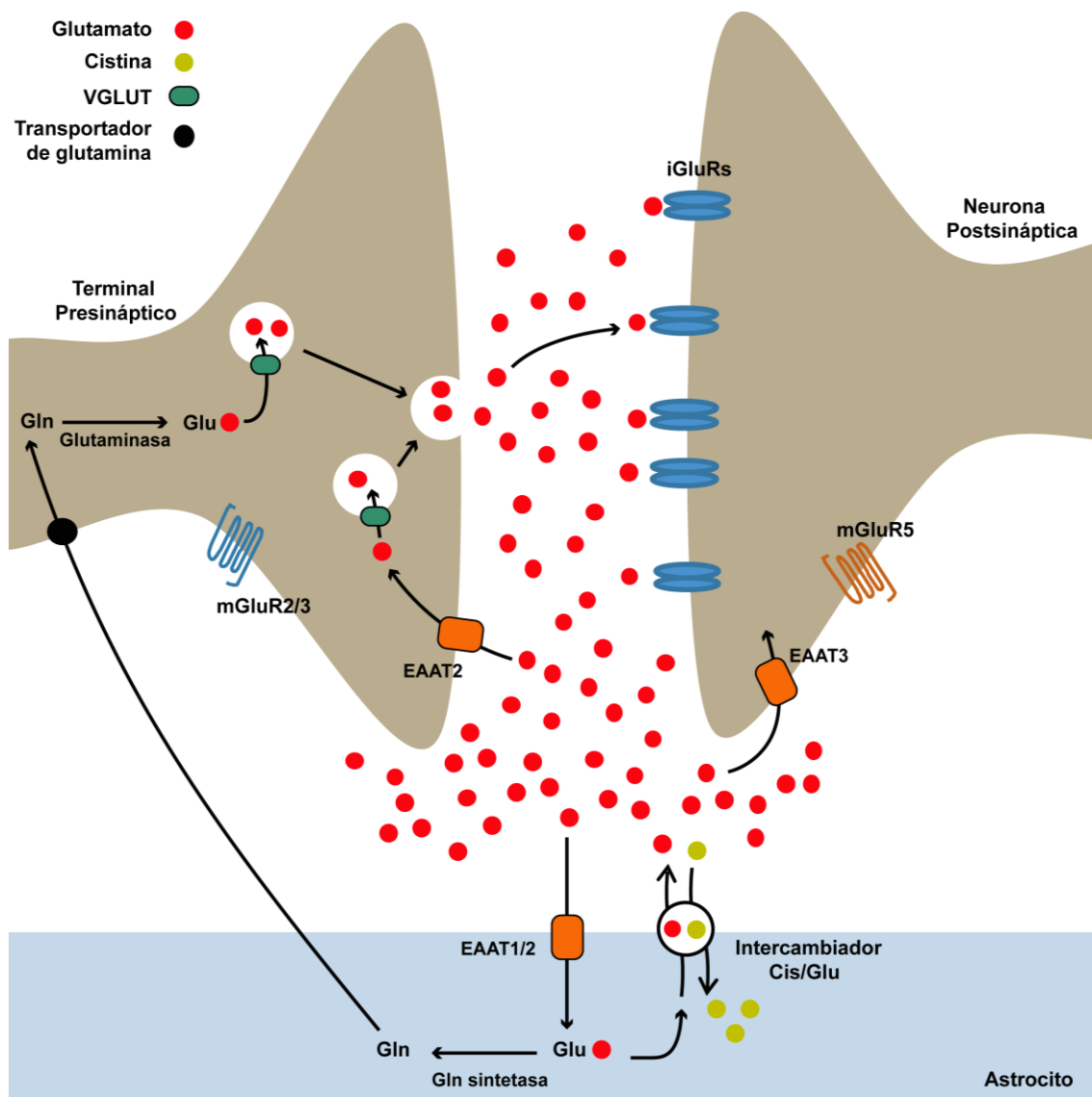


Figura 3. Síntesis, almacenamiento, liberación y recaptación de glutamato. Localización simplificada de receptores ionotrópicos, receptores metabotrópicos y transportadores de glutamato.

Receptores glutamatérgicos ionotrópicos y metabotrópicos

Estudios efectuados con agonistas y antagonistas selectivos han distinguido dos grandes familias de receptores glutamatérgicos: ionotrópicos (iGluRs), ligados a canales iónicos (Na^+ y Ca^{2+} , en menor medida K^+) que median las respuestas excitatorias rápidas, y los metabotrópicos (mGluRs), asociados a proteína G, que tienen un rol modulador en la transmisión glutamatérgica (Conn y Pin, 1997; Dingledine y col., 1999). Los receptores glutamatérgicos se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro y son más abundantes en la corteza, los núcleos de la base y las vías sensitivas.

Según estudios farmacológicos y electrofisiológicos, los receptores glutamatérgicos ionotrópicos se clasifican en tres subtipos: receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) y receptor kainato (KA).

Los receptores NMDA son heterómeros, compuestos por dos tipos de subunidades NR1 y NR2, ambas con isoformas y variantes de unión, lo que les otorga diversidad funcional en el encéfalo. Estructuralmente son canales iónicos activados por ligando que constan de subunidades cada una de las cuales tiene estructura “bucle-poro”.

La subunidad NR1 se expresa de forma constitutiva y las subunidades NR2A, NR2B, NR2C y NR2D tienen función moduladora. Los receptores NMDA presentan características y propiedades farmacológicas especiales. Son altamente permeables al ion Ca^{2+} y a otros cationes. Cuando la polarización de la célula es normal se encuentran bloqueados por Mg^{2+} a concentraciones fisiológicas. Este bloqueo es altamente dependiente del voltaje y se supera ante la despolarización de la membrana celular.

Los receptores NMDA tienen una alta afinidad por glutamato, pero no se activan directamente por unión del neurotransmisor a su sitio de acción. La activación del receptor requiere la presencia de glutamato y de un co-agonista como glicina (Danysz y Parsons, 1998) o D-serina (Barañano y col., 2001) cuyo sitio de unión al receptor es distinto que el de glutamato. Así, ambas localizaciones deben estar ocupadas para que el canal se abra. Cuando se activan, cumpliendo los requisitos previamente descritos, conducen la entrada de iones Na^+ y principalmente Ca^{2+} .

Estos receptores se distribuyen ampliamente en el cerebro y se localizan a nivel postsináptico tanto en el espacio sináptico como extrasináptico, y constituyen dos *pools* funcionales diferentes de receptores. Numerosos estudios han demostrado la distribución preferencial de los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B en el espacio extrasináptico (Papouin y col., 2012; Petralia, 2012). Se ha descrito que se expresan además en células gliales (Murugan y col., 2013; Verkhratsky y Kirchhoff, 2007). Están involucrados en excitotoxicidad, múltiples aspectos fisiológicos del cerebro ya que median el potencial

postsináptico excitatorio lento y funciones cognitivas tales como memoria y aprendizaje por estar implicados en plasticidad sináptica (Bliss y Collingridge, 1993), tanto en LTP como en LTD (Bennett, 2000, Malenka y Nicoll, 1993).

Los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B se encuentran presentes en estriado y corteza, presentan cinéticas de decaimiento lentas (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004) y una baja probabilidad de apertura comparada con los receptores que poseen la subunidad NR2A (Brigman y col., 2010).

La mayor parte de la transmisión sináptica excitatoria rápida en el cerebro está mediada por los receptores ionotrópicos AMPA (Bleakman y Lodge, 1998), un proceso clave para la función del encéfalo. Estos receptores se abren por la unión de glutamato a su sitio de acción en el receptor pero tienen la particularidad de que se desensibilizan rápidamente (Trussell y Fischbach, 1989) y tienen baja afinidad por el glutamato (Patneau y Mayer, 1990).

Los receptores AMPA funcionales son tetrámeros formados por dímeros de dímeros (Greger y Esteban, 2007; Mano y Teichberg, 1998; Rosenmund y col., 1998). Las subunidades que lo conforman son cuatro y se denominan desde GluR1 hasta GluR4 (Collingridge y col., 2009), lo que les otorga diversidad funcional. Independientemente de la composición de subunidades que los constituyen, estos receptores son permeables a iones Na^+ y K^+ . Sin embargo, los receptores AMPA que carecen de la subunidad GluR2 en su estructura, se vuelven permeables a iones Ca^{2+} , lo que le otorga importantes consecuencias funcionales tal como el aumento de la fuerza sináptica (Cull-Candy y col., 2006; Isaac y col., 2007; Liu y Zukin, 2007). Se distribuyen ampliamente en el encéfalo, se localizan a nivel postsináptico y en células gliales (Hösli y Hösli, 1993; Kettenmann y col., 2011; Liu y col., 2016; Murugan y col., 2013; Steinhauser y Gallo, 1996).

El tráfico de los receptores AMPA a la superficie de la membrana plasmática neuronal es un mecanismo importante para regular la fuerza sináptica en procesos de plasticidad sináptica (Malinow y Malenka, 2002; Brecht y Nicoll, 2003; Watt y col., 2004). Estudios han demostrado que aproximadamente el 90% de los receptores están constituidos por las subunidades GluR1 asociados a GluR2 o GluR3, siendo las subunidades GluR1-GluR2 las que conforman la principal población de receptores. Una menor población se encuentra constituida por las subunidades GluR2-GluR3, y en proporción aún menor se encuentran los receptores conformados por subunidad GluR1 como homómeros. El porcentaje de receptores AMPA sin la subunidad GluR2 en condiciones basales constituye un 5-10%, y no contribuye significativamente a la transmisión sináptica (Conrad y col., 2008).

Fisiológicamente, el proceso de tráfico de receptores es altamente dinámico y los receptores AMPA son continuamente intercambiados desde la sinapsis (superficie de membrana) a los *pools* de almacenamiento (Newpher y Ehlers, 2008; Shepherd y Huganir,

2007; Triller y Choquet, 2003). Para asegurar una efectiva transmisión sináptica, los receptores AMPA se anclan en la densidad postsináptica (PSD), una matriz densa, localizada debajo de la membrana plasmática y constituida principalmente por actina, proteínas de anclaje y elementos del citoesqueleto (Lisman y Raghavachari, 2006; Newpher y Ehlers 2008; Okabe, 2007). El número de receptores AMPA en la sinapsis no es fijo varía de acuerdo a la actividad sináptica, por lo que se los relaciona con la fuerza sináptica (Lisman y Raghavachari, 2006; Newpher y Ehlers, 2008).

Los receptores metabotrópicos (mGluR) son receptores monoméricos acoplados a proteína G excitatoria o inhibitoria y asociados a segundos mensajeros intracelulares (Conn y Pin, 1997). Dentro de la familia de receptores mGluR encontramos 8 subtipos diferentes de receptores denominados mGluR1-mGluR8. Tienen la particularidad de poseer una cola N-terminal extracelular grande, donde se encuentra el sitio de unión para el glutamato. Se encuentran subdivididos en tres grupos de acuerdo con la estructura, homología en la secuencia, propiedades farmacológicas y transducción de señales (Conn y Pin, 1997; Nakanishi, 1994). Estos receptores no sólo se expresan a nivel neuronal sino que se ha demostrado que también se expresan en células gliales (Kettenmann y col., 2011; Liu y col., 2016; Murugan y col., 2013; Spampinato y col., 2018).

El grupo I comprende los receptores mGluR1 y mGluR5 acoplados a proteína G_q , cuya estimulación activa a la enzima PLC, lo que conduce a la formación de inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). En general la activación de estos receptores conduce a la excitabilidad neuronal por activación de los receptores iGluR (Glaum y Miller, 1993). La localización de este tipo de receptores parecería estar restringida al terminal postsináptico (Shigemoto y col., 1997) en la perisinápsis (Baude y col., 1993; Nusser y col., 1994; Luján y col., 1996, 1997), aunque se ha sugerido que también podrían estar en la presinapsis (Ottersen y Landsend, 1997). La activación de estos receptores al estimular PLC, llevan a la liberación de iones Ca^{2+} desde el retículo endoplásmático al citosol, aumentando la concentración citosólica de iones Ca^{2+} , el DAG activa la proteína quinasa C (PKC) que modula los canales de calcio voltaje dependientes y disminuye la conductancia de los canales de potasio generando repolarización lenta (Francesconi y Duvoisin, 2000; Lesage y Steckler, 2010).

El grupo II comprende los receptores mGluR2 y mGluR3, mientras que el grupo III comprende los receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8, ambos grupos se encuentran acoplados a proteínas G inhibitoria (G_i/G_o) e inhiben la acción de la enzima AC lo que disminuye la formación de AMPc (Malherbe y col., 1999). Sin embargo, la potente acción de glutamato sobre los receptores del grupo II, que generalmente se activan en el rango de 0,3-20 μM de glutamato en comparación con el resto de los mGluR que se activan a concentraciones superiores, y su ubicación en la perisinápsis del terminal glutamatérgico, le otorgan relevancia

funcional en la regulación de los niveles extracelulares de glutamato (Cartmell y Schoepp, 2000).

Los mGluR2 y mGluR3 se encuentran principalmente ubicados en las neuronas presinápticas glutamatérgicas, donde actúan como autoreceptores inhibitorios modulando negativamente la liberación sináptica de glutamato (Shigemoto y col., 1997). Sin embargo, también existen estudios que reportan su expresión en la membrana postsináptica (Petralia y col., 1996). El mecanismo por el cual ejercen su efecto inhibitorio se debe a la potenciación de la acción de los canales de potasio presinápticos y supresión de la acción de los canales de calcio voltaje dependientes que intervienen directamente en la exocitosis de neurotransmisores (Conn y Pin, 1997; Ferraguti y Shigemoto, 2006; Kew y Kemp, 2005).

Además de estar expresados en las neuronas, los receptores mGluR3 se encuentran altamente expresados en las células gliales (Mineff y Valtschanoff, 1999; Ohishi y col., 1993, 1994; Tamaru y col., 2001), y dada la importante contribución de la glía en la recaptación y síntesis de glutamato, es probable que la activación de estos receptores dé lugar a importantes efectos funcionales, sobretodo en la comunicación neurona-glía (Winder y Conn, 1996).

El grupo III se encuentra predominantemente en neuronas presinápticas como autoreceptores suprimiendo la transmisión excitatoria (Conn y Pin, 1997; Shigemoto y col., 1997).

La activación de los mGluR mediante la estimulación de aferentes glutamatérgicos o la aplicación exógena de agonistas de los mGluR da lugar a acciones amplias y diversas sobre la excitabilidad neuronal mediante la modulación de una variedad de canales iónicos dependientes e independientes del voltaje (Conn y Pin, 1997; Gerber y Gähwiler, 1994; Westbrook y col., 1993), por lo que juegan un rol importante a nivel de potenciales postsinápticos excitatorios o inhibitorios.

Intercambiador Cistina/Glutamato

El intercambiador Cis/Glu, también conocido como sistema Xc^- , es un sistema de transporte presente en la membrana plasmática responsable de internalizar cistina a la célula y liberar glutamato al medio en relación estequiométrica 1:1 (McBean, 2002) mediante un mecanismo independiente de Na^+ y ATP (Danbolt, 2001). Como se observa en la figura 3, se encuentra predominantemente expresado en células gliales junto con otros transportadores glutamatérgicos (Kettenmann y col., 2011; Malarkey y Parpura, 2008). Es el principal regulador de la concentración de glutamato extrasináptico en el SNC. Particularmente en NAc core, el 60% del glutamato basal extracelular deriva constitutivamente del intercambiador Cis/Glu (Baker y col., 2002).

Este intercambiador, altamente expresado en el cerebro, está compuesto por dos subunidades, una subunidad catalítica de cadena liviana xCT y otra de cadena pesada glicoproteica (4F2hc) (Sato y col., 1999). La cistina (Cis-S-S-Cis) incorporada a la célula por este intercambiador es un precursor en la síntesis de glutatión (GSH), el cual juega un rol crítico en las respuestas contra el estrés oxidativo (Griffith, 1999; Sato y col., 2002). El sistema Xc⁻ regula el estado redox de la célula al desplazar a la cistina oxidada (Cis-S-S-Cis) a un estado reducido (Cis-SH). Dado que la cistina es un aminoácido clave en la biosíntesis de glutatión y el glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia del cerebro y uno de los más abundantes, el sistema Xc⁻ juega un papel crucial no sólo en la defensa antioxidante sino también en la señalización glutamatérgica. Por otro lado, es importante destacar que el sistema Xc⁻ trabaja en concierto con los transportadores de glutamato. De esta manera, el glutamato liberado por el intercambiador Cis/Glu es recaptado luego por los transportadores de glutamato. A su vez, la cistina que ingresa a la célula por el intercambio con glutamato, favorece la síntesis de GSH en cada ciclo de intercambio cistina-glutamato.

En el campo de la adicción a drogas, el rol del intercambiador Cis/Glu cobra relevancia ya que, en modelos animales, se ha demostrado una reducción de los niveles proteicos de la subunidad catalítica xCT y la funcionalidad del intercambiador en NAc core tras la administración crónica de cocaína o nicotina (Baker y col., 2003; Kalivas, 2009; Knackstedt y col., 2010; Tranthan-Davidson y col., 2012). Consistentemente, tras la administración crónica de cocaína se observó una disminución de los niveles basales extracelulares de glutamato en NAc core monitoreados mediante la técnica de microdiálisis *in vivo* a través del método de *no net flux* (Knackstedt y col., 2010; Tranthan-Davidson y col., 2012).

Transportadores de glutamato

Si bien el glutamato cumple importantes funciones fisiológicas, concentraciones elevadas a nivel extracelular pueden resultar neurotóxicas. Considerando las enormes cantidades de glutamato en el cerebro, este órgano requiere potentes sistemas de protección. Debido a que no existe una conversión extracelular de glutamato significativa, el tejido cerebral requiere una importante actividad de captación de glutamato para protegerse contra la toxicidad del glutamato. Uno de los mecanismos involucrados en remover el glutamato libre del espacio sináptico y encargado de mantener constantemente las concentraciones extracelulares en niveles óptimos es la recaptación de glutamato mediante transportadores, los cuales se expresan en células gliales y neuronas (Danbolt, 2001). Estos transportadores mantienen un control riguroso sobre la señal glutamatérgica sináptica para limitar el daño por excitotoxicidad y la activación sostenida de receptores glutamatérgicos iGluR y mGluR (Bergles y col., 1999).

Los transportadores dependientes de iones Na^+/K^+ de alta afinidad por glutamato y aspartato constituyen la familia de transportadores *solute carrier 1* (SLC1), la cual se encuentra conformada por cinco miembros de transportadores de amino ácidos excitatorios (EAAT) denominados EAAT1/GLAST/slc1a3, EAAT2/GLT-1/slc1a2, EAAT3/EAAC1/slc1a1, EAAT4/slc1a6 y EAAT5/slc1a7 (Beart y O'Shea, 2007; Danbolt, 2001; Danbolt y col., 2016; Kanai y Hediger, 2004; Zhou y Danbolt, 2013). El L-glutamato y el DL-aspartato se transportan con afinidades similares, mientras que el D-glutamato no es transportado por estos transportadores (Danbolt y col., 2016). Los transportadores utilizan los gradientes electroquímicos de iones Na^+ , K^+ y H^+ como fuentes impulsoras para el proceso de transporte (Billups y col., 1996; Zerangue y Kavanaugh, 1996; Levy y col., 1998). Con respecto a la estequiometría de transporte, se ha reportado que los EAAT catalizan el transporte de una molécula de sustrato junto con 1H^+ y 3Na^+ hacia el interior de la célula acoplado al contra-transporte de 1K^+ hacia el espacio extracelular (Danbolt y col., 2016).

EAAT1 y EAAT2, generalmente llamados GLAST y GLT-1 respectivamente, se expresan predominantemente en astrocitos, cuyos procesos rodean las sinapsis glutamatérgicas. Estos transportadores se localizan en los procesos astrogliales, vecinos a la hendidura sináptica, donde son los responsables de remover inmediatamente el 90-94% del glutamato liberado en el cerebro de mamíferos (Rothstein, 1995b, 1996; Danbolt, 2001; Mitani y Tanaka, 2003). Los EAAT3-5 tienen una distribución anatómica diferente, se expresan en las neuronas (Amara y Fontana, 2002) y su contribución a la recaptación de glutamato es menor debido a sus bajos niveles de expresión (Holmseth y col., 2012).

El GLT-1 es el principal transportador de glutamato del cerebro anterior. Se demostró que EAAT2 representa el 1% del total de proteína del cerebro anterior (Lehre y Danbolt, 1998). Está presente en la mayoría (sino en todos) los astrocitos de la neocorteza, estriado y tálamo, así como en los astrocitos de la materia blanca (Lehre y col., 1995). Prácticamente su expresión es dominante en el SNC excepto en regiones donde predomina GLAST como en retina (Rauen y col., 1999), cerebelo (Lehre y Danbolt, 1998), órganos circunventriculares (Berger y Hediger, 2000), en astrocitos y principalmente en oligodendrocitos de la materia blanca (Danbolt, 2001; Matute, 2011). Tanto GLT-1 como GLAST se expresan generalmente en los mismos astrocitos pero en diferentes proporciones en diferentes áreas cerebrales (Danbolt, 2001).

Los valores en K_m (constante de afinidad) reportados para el transporte de L-glutamato por EAAT1 suelen estar en el rango 7-20 μM (Arriza y col., 1994; Wadiche y Kavanaugh, 1998; Klöckner y col., 1993). Los valores correspondientes para EAAT2 y EAAT3 son, respectivamente, 12-18 μM (Arriza y col., 1994; Levy y col., 1998; Bergles y col., 2002) y 8-30 μM (Arriza y col., 1994; Kanai y col., 1994; Kanai y Hediger, 1992; Grewer y col., 2000). EAAT4 tiene la mayor afinidad con valores de K_m en el rango de 0,6-3,3 μM (Fairman y col.,

1995; Lin y col., 1998; Koch y col., 2007), mientras que EAAT5 tiene la menor afinidad con valores de K_m en el rango de 61-63 μM (Gameiro y col., 2011; Schneider y col., 2014).

El estudio del transportador GLT-1 cobra relevancia ya que su alteración ha sido asociada a neuropatologías en modelos animales como epilepsia (Petr y col., 2015; Tanaka y col., 1997), enfermedades neurodegenerativas como esclerosis lateral amiotrófica (Rothstein y col., 1995), isquemia cerebral (Chen y col., 2005; Rao y col., 2001), depresión (Rappeneau y col., 2016) y adicción (Kalivas, 2009). Específicamente, se ha demostrado una disminuida expresión de GLT-1 en NAc core en modelos animales con historia previa de autoadministración crónica de cocaína, nicotina y heroína (Knackstedt y col., 2010; Gipson y col., 2013; Shen y col., 2011), alteración que conduce a una desregulación de la homeostasis glutamatergica (Knackstedt y col., 2010; Trantham-Davidson y col., 2012; Gipson y col., 2013).

Glutamato en el Sistema Nervioso

Las vías nerviosas que utilizan glutamato son numerosas: a) vías descendentes largas que se originan en las células piramidales de la corteza y proyectan al estriado, sistema límbico, diencefalo y estructuras del tronco cerebral; b) vías sensoriales aferentes, auditivas y periféricas que penetran el asta posterior de la médula espinal, c) vías de proyección del hipocampo al septum, neuronas intraestriatales e intrahipocámpicas, y d) interneuronas de la médula espinal. Algunas de estas proyecciones se encuentran diagramadas en la figura 4.

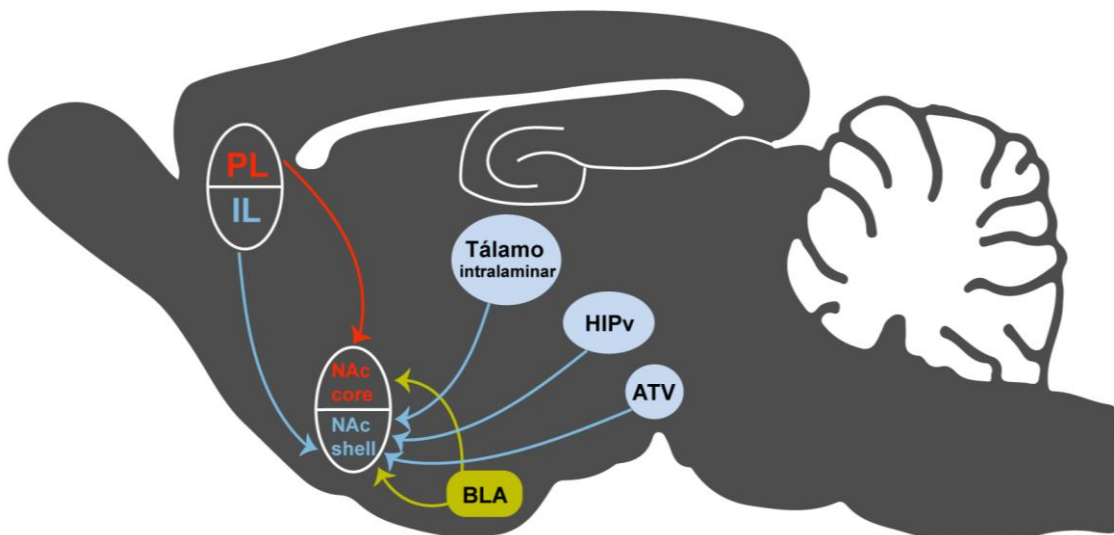


Figura 4. Aferentes glutamatergicos a NAc involucrados en conductas adictivas. Imagen adaptada de Gipson y col., 2014. PL: Corteza Prefrontal prelímbica, IL: Corteza Prefrontal infralímbica, BLA: Amígdala basolateral, HIPv: Hipocampo ventral y ATV: Área Tegmental Ventral.

CÉLULAS GLIALES

Las células gliales ejercen un rol crítico en la regulación de la actividad neuronal. Particularmente, la contribución de astrocitos al control de la actividad sináptica ha sido ampliamente estudiada. En los últimos años, estudios emergentes señalan la participación activa de la microglía en el control de la actividad neuronal (Béchade y col., 2013). No obstante, existen otras células gliales, los oligodendrocitos, que si bien contribuyen a la regulación de la función neuronal, su estudio está fuera del alcance de esta tesis.

Astroцитos

Los astrocitos son las principales células no neuronales del SNC, cuyo número supera al de las propias neuronas en una proporción diez a uno (10:1). Constituyen más del 50% de las células del SNC (Liu y col., 2011). Fisiológicamente, estas células tienen una morfología estrellada con un cuerpo celular central y poseen largos procesos que se extienden en todas sus direcciones. Aunque no están equipados con la maquinaria celular necesaria para generar potenciales de acción, los astrocitos exhiben, si bien a una escala temporal más lenta que las neuronas, cambios en sus propiedades eléctricas basadas en variaciones de la concentración citoplasmática de iones Ca^{2+} , las cuales son esenciales para la actividad neuronal normal (Perea y col., 2009).

Los astrocitos tienen una función mucho más amplia que la de servir de apoyo a las neuronas del cerebro, ya que tienen funciones especializadas en la inducción y regulación de la barrera hematoencefálica (BHE), protegen a las neuronas contra los excesos de los neurotransmisores, promueven la plasticidad sináptica, coordinan la actividad neuronal mediante la comunicación directa con las neuronas, regulan el metabolismo energético y redox, y participan en diversos procesos de señalización ya que responden a señales químicas procedentes tanto de las neuronas como de los astrocitos vecinos y la microglía (Bezzi y Volterra, 2001; Magistretti, 2006; Middeldorp y Hol, 2011; Perea y Araque, 2007).

Un componente clave del citoesqueleto del astrocito es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Clásicamente, GFAP es un marcador de astrocitos, cuya expresión se altera ante envejecimiento, situaciones estresantes, injuria cerebral o neurodegeneración. El incremento de su nivel de expresión ha sido asociado a la activación astrogliar.

La mayoría de los estudios, utilizan anticuerpos anti-GFAP para visualizar los astrocitos. Generalmente, la inmunotinción de GFAP expone las células con una morfología estelar, característica de los astrocitos diferenciados. GFAP en los astrocitos ha sido asociada a numerosas funciones tales como exocitosis, migración, proliferación, funcionamiento de la

barrera hematoencefálica, plasticidad sináptica, mielinización, protección ante lesiones, autofagia, señalización en vías de transducción de señal de crecimiento de las neuronas e interacción neurona/glía (Middeldorp y Hol, 2011).

Los astrocitos expresan en su membrana transportadores de neurotransmisores como glutamato (Anderson y Swanson, 2000), GABA (Schousboe, 2000) y glicina (Jursky y Nelson, 1996). La captación de los transmisores no sólo es necesaria para regular y modular la transmisión sináptica, sino que este proceso forma parte del ciclo que proporciona a los terminales presinápticos una fuente renovable de estos transmisores.

En los últimos años se ha establecido que el GFAP desempeña un papel fundamental en la modulación de los niveles y la función de los transportadores de glutamato astrocítico y neuronal. En preparaciones sinaptosómicas corticales e hipocampales de ratones adultos knockout GFAP^{-/-} se encontró una reducción de la captación de glutamato junto a una reducción de la actividad de transporte de glutamato, observándose que tanto los subtipos de transportador astrocíticos (EAAT1/GLAST) como los neuronales (EAAT3/EAAC1) se redujeron ante la ausencia de GFAP (Middeldorp y Hol, 2011). Además, en astrocitos corticales se demostró que ante la ausencia de GFAP el transportador de glutamato EAAT2 (GLT-1) no se transportaba a la membrana plasmática de la célula (Hughes y col., 2004).

Los astrocitos interactúan con las neuronas en múltiples escalas espaciales y temporales. En el SNC, estas células gliales ocupan territorios espaciales no superpuestos en los que un sólo astrocito extiende miles de procesos membranosos finos, muchos de los cuales entran en contacto con múltiples somas neuronales y las sinapsis (Bushong y col., 2002; Halassa y col., 2007) para proporcionar apoyo metabólico y mantener la integridad de la comunicación neuronal (Parpura y Verkhratsky, 2013).

Los procesos de cada astrocito entran en contacto con decenas de miles de sinapsis (Ventura y Harris, 1999) formando una estructura conocida como sinapsis tripartita que denota la estrecha relación estructural y funcional entre el astrocito y los terminales pre y postsinápticos (Araque y col., 1999; Perea y col., 2009).

Los astrocitos están íntima y estratégicamente asociados con la microvasculatura cerebral, sobre la que se extienden varios procesos finales (Simard y col., 2003), característica que le otorga una importante función a nivel metabólico ya que vinculan a las neuronas con el suministro vascular de glucosa (Parpura y Verkhratsky, 2013). Estas células gliales expresan, además, transportadores que median la captación de glucosa de los microvasos cerebrales.

Una importante característica estructural y de señalización de los astrocitos es que a diferencia de las neuronas y la microglía, los astrocitos se conectan entre sí mediante proteínas de unión *gap junction* (Theis y col., 2005), lo que les permite formar un conjunto de células interconectadas con alta capacidad funcional (Zorec y col., 2012). Este acoplamiento

intercelular permite la difusión de iones Ca^{2+} y otras pequeñas moléculas como glucosa o inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) entre células adyacentes de la red de astrocitos (Rouach y col., 2008), generando un profundo impacto en la actividad y el metabolismo neuronal.

En condiciones de alta actividad neuronal y bajo suministro metabólico, el acoplamiento metabólico astrocítico es esencial para mantener la transmisión sináptica glutamatérgica. Después de su absorción por los astrocitos, la glucosa se almacena como glucógeno o se metaboliza en lactato (Tsacopoulos y Magistretti, 1996). El metabolismo del glucógeno astrocítico está regulado por mecanismos neuronales. La relación metabólica entre las neuronas y los astrocitos es un proceso muy dinámico. El metabolismo de los astrocitos opera a través de la generación de trifosfato de adenosina (ATP) a partir de la glucólisis, cuyo subproducto es el lactato (Turner y Adamson, 2011), el cual es liberado en el espacio extracelular, donde es absorbido por las neuronas (Sorg y Magistretti, 1991). El lactato sirve como un componente clave del ciclo metabólico neuronal utilizado para generar el ATP que sirve a las demandas de energía de la transmisión sináptica (Turner y Adamson, 2011).

Curiosamente, los astrocitos son también un componente importante del sistema de señalización neuroinmune del cerebro (Farina y col., 2007). Los astrocitos expresan múltiples receptores inmunes, particularmente receptores de citoquinas, que les permiten participar en los procesos inmunológicos (Jensen y col., 2013). Así, en respuesta a una lesión u otros estímulos perjudiciales para el tejido cerebral, los astrocitos experimentan un proceso de activación o gliosis reactiva que permite limitar el daño a los tejidos (Pekny y Pekna, 2014), pueden secretar una variedad de moléculas de señalización neuroinflamatoria (Lau y Yu, 2001), reclutar células microgliales al sitio de lesión y participar en la regulación del tráfico de células inmunes al SNC desde los vasos sanguíneos (Tian y col., 2012).

Aparte del rol de los astrocitos a nivel metabólico y neuroinmune, otra de sus principales funciones es la de preservar la homeostasis del espacio extracelular al controlar los niveles de iones K^+ y glutamato (Parpura y Verkhratsky, 2013), por lo que el acoplamiento entre astrocitos y su acción en concierto en una región concreta del cerebro también favorece el control del medio químico en que actúan las neuronas.

El glutamato extracelular puede activar los receptores glutamatérgicos astrocíticos (Mayhew y col., 2015; Spampinato y col., 2018). Así, los astrocitos son capaces de responder a la actividad sináptica cercana con una elevación de los niveles de iones Ca^{2+} intracelulares y establecer una íntima comunicación bidireccional con las sinapsis, ya que pueden activar directamente los receptores neuronales mediante la liberación estrictamente regulada de gliotransmisores (Haydon, 2001; Volterra y Meldolesi, 2005).

El término gliotransmisores involucra a transmisores químicos liberados desde las células gliales mediante diferentes mecanismos, proceso denominado gliotransmisión. Este

proceso incluye los transmisores clásicos como glutamato, péptidos, ATP, D-serina, quimiocinas y citoquinas (Halassa y Haydon, 2010; Santello y col., 2012; Volterra y Bezzi, 2002).

El acoplamiento intercelular de astrocitos permite la propagación de aumentos transitorios en la concentración intracelular de iones Ca^{2+} , a través de las células conectadas, fenómeno que se denomina ondas de calcio, las cuales desempeñarían un rol clave en la iniciación de la gliotransmisión organizada con el fin de sincronizar los patrones de disparo neuronal (Poskanzer y Yuste, 2011). Así, un sólo astrocito puede sincronizar un grupo de neuronas con las que entra en contacto mediante la gliotransmisión glutamatérgica (Halassa y col., 2007), información que se propaga, incluso a distancias significativas, mediante ondas de calcio en la red de astrocitos (Perea y col., 2009). Estas ondas de calcio en astrocitos son capaces de desencadenar una respuesta de activación y quimioatracción de la microglía (Davalos y col., 2005; Liu y col., 2011; Schipke y col., 2002; Sieger y col., 2012), posiblemente como mecanismo para "notificar" a la microglía local y distante, la magnitud de la desregulación de la transmisión de glutamato permitiendo su rápida respuesta si las concentraciones se acercan a los umbrales tóxicos.

Importantemente, la gliotransmisión glutamatérgica regulada por los niveles de iones Ca^{2+} intracelulares se dirige a los receptores neuronales extrasinápticos NMDA que contienen la subunidad NR2B, lo que da lugar a cambios en la excitabilidad neuronal y a la modulación de la transmisión sináptica (Halassa y Haydon, 2010).

Particularmente, la gliotransmisión glutamatérgica ha recibido una atención especial, ya que por un lado, los astrocitos juegan un papel central en la transmisión sináptica glutamatérgica al ser el único suministro de glutamina, precursor en la síntesis del glutamato, a las neuronas (Albrecht y col., 2010; Parpura y Verkhratsky, 2013) y, por otro lado, están vinculados a la regulación de la transmisión sináptica excitadora y la plasticidad sináptica (Santello y col., 2012).

La importancia de los astrocitos para mantener los niveles de glutamato extracelulares dentro de los límites fisiológicos se pone de manifiesto en numerosas investigaciones de excitotoxicidad, epilepsia y neurodegeneración (Danbolt y col., 2016; Mahmoud y col., 2019; Petr y col., 2015; Rothstein y col., 1996). Los astrocitos regulan estrictamente los niveles de glutamato sináptico y no sináptico a través de la liberación coordinada y la captación de glutamato (Moussawi y col., 2011a; Parpura y Verkhratsky 2013) mediante diversos mecanismos (Malarkey y Parpura, 2008). Entre ellos, el intercambio de glutamato que se produce por medio del *antiporter* Cis-Glu (Xc^-) y los transportadores de glutamato gliales dependientes de Na^+ , en particular GLT-1, han sido ampliamente estudiados en modelos de adicción, siendo los mecanismos claves que favorecen la desregulación de la homeostasis de

glutamato en NAc core tras la exposición repetida a drogas de abuso (Kalivas, 2009). Estos estudios demostraron que la administración sistémica de N-acetilcisteína (NAC), una droga que mimetiza la acción de la cistina endógena activando el sistema Xc⁻ y aumentando el glutamato extracelular, evitó la reinstalación de la conducta de búsqueda de cocaína en animales previamente expuestos a la droga que habían sido sometidos a un protocolo de extinción de la conducta de autoadministración (Baker y col., 2003). Dicho mecanismo estaría íntimamente asociado a la regulación de los niveles de GLT-1 (Reissner y col., 2015). A través de estos mecanismos de liberación y recaptación de glutamato glial, se ha reportado que los astrocitos regulan la plasticidad sináptica en NAc que subyace a las conductas adictivas (Kalivas, 2009).

Microglía

Las células microgliales representan el 10-20% del total de células del parénquima cerebral y son menos numerosas en la materia blanca que en la materia gris (Lynch, 2009). Estas células inmunocompetentes, conocidas como los macrófagos residentes del SNC, constituyen el sistema inmune innato y son consideradas la principal línea de defensa contra patógenos u otras alteraciones del tejido cerebral (Kreutzberg, 1996).

Aunque existen evidencias minoritarias basadas en experimentos *in vitro* que postulan que la microglía tendría origen neuroectodérmico (Fedoroff, 1995), actualmente se sabe que, de manera similar a los macrófagos, derivan de células precursoras mesodérmicas embrionarias (Kettenmann y col., 2011). De hecho, están relacionadas genéticamente con células de linaje fagocitario mononuclear, a diferencia de todos los demás tipos de células del SNC (Hickey y col., 1992; Ling y Wong, 1993). Una de las evidencias que apoya este origen demuestra que la microglía comparte los marcadores fenotípicos de los monocitos y macrófagos, muchos de los cuales son antígenos de superficie con importantes propiedades funcionales (McGeer y McGeer, 1995).

La microglía expresa una gran variedad de receptores, entre los que se encuentran receptores para la mayoría de los neurotransmisores tales como glutamato, GABA, acetilcolina, dopamina, noradrenalina, receptores para moduladores de la transmisión nerviosa como cannabinoides y opioides, receptores de patrones moleculares asociados a patógenos o a daños (PAMPs/DAMPs) y tipo Toll (ejemplo; TLR2 y TLR4), receptores purinérgicos, receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides, receptores de neurotrofinas, citoquinas, quemoquinas, complemento y factor estimulante de colonia de macrófagos (Kettenmann y col., 2011). Este variado repertorio de receptores le otorga una gran diversidad funcional.

Su capacidad para responder rápidamente a una variedad de moléculas de señalización, incluso selectivamente a las moléculas que intervienen en la neurotransmisión, les permite, en

su estado ramificado de "reposo", vigilar continuamente la integridad fisiológica de su microambiente y reaccionar inmediatamente en caso de detectar perturbaciones en el medio (Davalos y col., 2005). Esto sugiere que su aparente estado quiescente no es un estado estático sino que representa un estado de alerta inmunológica ante los cambios en su medio extracelular (Kreutzberg, 1996), el cual se acompaña fisiológicamente de un remodelamiento estructural dinámico, sin traslación del cuerpo celular, que favorece la extensión y retracción de sus procesos para monitorear constantemente el entorno sin perturbar los circuitos neuronales (Walker y col., 2013, 2014).

Por otro lado, la microglía puede exhibir otro patrón de movimiento con capacidad de migración dentro del tejido cerebral. La migración celular juega un papel central en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Así, la migración se produce durante el desarrollo, o después de un insulto patológico cuando estas células se "activan" volviéndose ameboides y adquieren capacidad para migrar al sitio de la lesión.

Una de las propiedades más intrigantes de la microglía es que poseen independencia física, es decir que no están permanentemente en contacto unas con otras, lo que les proporciona una excelente estrategia para maximizar la eficiencia con la que realizan su función de sensar el microambiente que las rodea (Jinno y col., 2007). Esta característica las distingue de las neuronas, que están ampliamente vinculadas mediante sinapsis electroquímicas, y de los astrocitos, que si bien poseen dominios discretos, exhiben una amplia conexión con otros astrocitos mediante conexinas y con la vasculatura (Bushong y col., 2002; Graeber, 2010).

Fisiológicamente, la microglía tiene un rol crítico en la formación de las sinapsis y en su eliminación dependiente de la actividad neuronal (Kettenmann y col., 2011). Así por ejemplo, se ha reportado que estas células están involucradas en la eliminación de las sinapsis durante el desarrollo (Stevens y col., 2007; Paolicelli y col., 2011), en el proceso de *pruning* de las sinapsis en el cerebro postnatal (Kettenmann y col., 2011) y pueden modular activamente las funciones neuronales, incluyendo el aprendizaje y la memoria (Delpech y col., 2015; Blank y Prinz, 2013).

En condiciones fisiológicas los procesos microgliales entran en contacto físico con los elementos sinápticos (Tremblay y col., 2010, 2011; Schafer y col., 2012; Wake y col., 2009), lo que permite una importante comunicación directa neurona-microglía y un control preciso de la función sináptica, siendo la integridad de la señalización microglial un factor crucial para la homeostasis de la neurotransmisión (Costello y col., 2011; Kierdorf y Prinz, 2013). Un ejemplo de la interacción neurona-microglía lo proporciona un estudio realizado con ratones que tienen deficiencia de CD200. CD200R es una proteína de membrana expresada exclusivamente por la microglía. Su ligando, CD200, se expresa en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos (Costello y col., 2011). Otro ejemplo es la interacción entre la quimiocina neuronal fractalquina (CX3CL1)

y CX3CR1, el receptor microglial de esta quimiocina. Esta expresión complementaria de ligando y receptor en las neuronas y la microglía respectivamente, sugiere que su interacción puede desempeñar un papel en la modulación de la neurotransmisión (Kierdorf y Prinz, 2013).

La microglía produce un amplio espectro de moléculas de señalización que modulan la actividad sináptica y la plasticidad neuronal. Entre ellas se incluyen el ATP (Pascual y col., 2012), los neurotransmisores (Piani y Fontana, 1994; Hayashi y col., 2006; Flierl y col., 2007; Pascual y col., 2012), las proteínas de la matriz extracelular (MEC; Chamak y col., 1994) que ampliaron el concepto de sinapsis tripartita a cuatripartita (Dityatev y Rusakov, 2011), y las citoquinas (Elkabes y col., 1996; Hanisch, 2002) que pueden actuar autócrinamente (Sternberg, 2006) y entre las cuales el TNF- α merece una atención especial. Se ha demostrado que esta citoquina proinflamatoria controla las funciones sinápticas basales (Santello y col., 2011), así como la plasticidad sináptica (Stellwagen y Malenka, 2006; Kaneko y col., 2008; Costello y col., 2011; Santello y col., 2011) y regula la expresión astrogliar del transportador de glutamato GLT-1 (Carmen y col., 2009; Tilleux y Hermans, 2007; Tolosa y col., 2011).

Particularmente, las células microgliales tienen una importante participación en la neurotransmisión glutamatérgica. Frente a ciertas condiciones y estímulos pueden expresar el intercambiador Xc^- (Barger y col., 2007; Piani y col., 1992; Quin y col., 2006). Además, si bien expresan transportadores de glutamato como GLT-1, solo se encargan del 10% de la recaptación de glutamato mientras que su expresión se exagera en condiciones patológicas (Kettenmann y col., 2011), lo que denota que las células microgliales sirven como sistema de respaldo frente a alteraciones en la transmisión glutamatérgica, mientras que la principal contribución a la recaptación de glutamato la ejercen los astrocitos (Liang y col., 2008; Danbolt y col., 2016; Zhang y col., 2011).

En conjunto, la microglía y los astrocitos interactúan con las sinapsis neuronales para regular la transmisión sináptica. Por lo tanto, alteraciones en el funcionamiento glial podrían desencadenar cambios en el funcionamiento neuronal.

Marcadores fenotípicos

La identificación de marcadores específicos de la microglía resulta sumamente valiosa para evaluar sus distintas contribuciones a la homeostasis cerebral. Existe una gran variedad de marcadores de la microglía. Entre los más destacados, la microglía expresa el receptor CSF-1 (CSF-1R también llamado CD115), el receptor de fractalquina (CX3CR1), las glicoproteínas F4/80 y CD68, la integrina CD11b y la proteína Iba-1.

El nivel de expresión de muchas de estas moléculas, como por ejemplo CD11b o Iba-1, aumenta en función de la activación microglial (Ito y col., 1998, 2001; Morrison y Filosa,

2013). Por otro lado, las estructuras del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII), junto con moléculas accesorias para la presentación de antígenos (CD80/86), sólo son expresadas por la microglía activada (Zhang y col., 2002).

Iba-1, involucrada en la homeostasis de iones Ca^{2+} , se utiliza a menudo como marcador de la microglía por ser muy útil para visualizar con detalle los procesos microgliales (Kettenmann y col., 2011).

En condiciones fisiológicas, las células microgliales expresan niveles de CD45 mucho más bajos (CD45^{low} , microglía en parénquima cerebral) o intermedio (CD45^{int} , otros macrófagos asociados al SNC) en comparación a los altos niveles expresados por los macrófagos ($\text{CD45}^{\text{high}}$). Así, la separación de poblaciones en $\text{CD11b}^+ \text{CD45}^{\text{low}}$ y $\text{CD11b}^+ \text{CD45}^{\text{high}}$, por ejemplo, en los análisis de citometría de flujo, pueden utilizarse para diferenciar la microglía del parénquima cerebral de los macrófagos infiltrantes (Kettenmann y col., 2011; Kreutzberg, 1996).

Activación de la microglía

Durante décadas, el cerebro ha sido considerado un "órgano inmuno-privilegiado", el cual no era susceptible ni contribuía a la inflamación (Zipp y Aktas, 2006). Actualmente, estudios bioquímicos del tejido nervioso bajo diversas circunstancias fisiológicas y patológicas han revelado que la inflamación del SNC constituye la principal defensa del huésped contra las lesiones e infecciones cerebrales. En contraste con la rápida y masiva invasión de leucocitos y el edema que se observan en los tejidos periféricos, a nivel central la respuesta neuroinflamatoria tiene características distintivas, como el reclutamiento y la inmediata activación de las células inmunes residentes, la microglía (Lucas y col., 2006).

Una gran variedad de patologías cerebrales han sido asociadas a la activación microglial temprana entre ellas la encefalitis autoinmune (Matsumoto y col., 1992), autismo y esquizofrenia (Gupta y col., 2014; Sekar y col., 2016), enfermedad de Alzheimer (Streit y col., 2009), Parkinson (Depino y col., 2003), esclerosis múltiple (Nelson y col., 2002), depresión (Miller y Raison, 2015) y dolor neuropático (Milligan y Watkins, 2009; Taylor y col., 2015) lo que ha llevado a proponer el concepto de microgliopatías para designar condiciones patológicas en las que la disfunción microglial es el centro del proceso de la enfermedad (Sasaki, 2016).

La microglía se ha descrito inicialmente como sensores de eventos patológicos (Kreutzberg, 1996). Sin embargo, en la actualidad se acepta ampliamente que estas células no sólo son sensores sino también actores claves en el inicio de una patología en el cerebro y agentes activos de estados patológicos.

Se ha detectado una amplia variedad de moléculas que sirven de señales para la microglía con potencial para desencadenar eventos patológicos, entre ellas ATP (Walker y col.,

2014), cannabinoides (Walter y col., 2003), morfina (Zhang y col., 2012), moléculas que estimulan la respuesta proinflamatoria (Walker y col., 2014), glutamato (Mayhew y col., 2015), cocaína (Northcutt y col., 2015), e incluso moléculas liberadas tras la exposición a eventos estresantes (Frank y col., 2011, 2012; Nair y Bonneau, 2006).

En condiciones fisiológicas, la microglía, en estado de reposo, tiene una morfología ramificada, un pequeño soma con procesos celulares finos y muestran un inmunofenotipo adaptado al microambiente especializado tisular. Cualquier perturbación de la homeostasis cerebral que indique un peligro real o potencial para el SNC, por ejemplo infección, traumatismo, tumores cerebrales, isquemia, alteración de la actividad neuronal, cambios en la concentración de iones y neurotransmisores o incluso una alteración homeostática sutil que precede a una alteración patológica (Hanisch y Kettenmann, 2007; Kettenmann y col., 2011; Kreutzberg, 1996), puede generar cambios rápidos y profundos en la morfología, la expresión de antígenos de superficie y la función celular (Kreutzberg, 1996; Lynch, 2009), procesos que, en conjunto han sido definidos como activación microglial (Colton y Wilcock, 2010, Graeber y Streit, 2010; Streit y col., 1999).

El término activación hace referencia a un aumento de la capacidad de la célula para realizar una función más allá de la presente en su estado basal (Liu y col., 2011). Por consiguiente, los parámetros más ampliamente utilizados para establecer el estado de activación de la microglía son los cambios funcionales, el número, la morfología o la expresión de genes y de ciertas proteínas inducibles o expresadas constitutivamente por estas células (Hanisch y Kettenmann, 2007; Streit y col., 1999; Walker y col., 2014). Sin embargo, es importante destacar que dado que la microglía ejerce su función de manera constante, sin padecer períodos de inactividad, el proceso de transformación microglial desde su estado fisiológico de reposo y vigilancia a un estado activado representa más un cambio de actividades que una "activación" *per se*. Además, el término activación no contiene ninguna información sobre la orientación funcional que decide las consecuencias para el SNC (Town y col., 2005).

La activación de la microglía se produce como una respuesta gradual *in vivo*, no representa un proceso de "todo o nada", ni tampoco implica una trayectoria lineal con un resultado uniforme fijo, sino que, por el contrario, la microglía activada puede adquirir distintos estados funcionales según los estímulos sentidos en el ambiente en el que se encuentra (Hanisch y Kettenmann, 2007; Kettenmann y col., 2011; Schwartz y col., 2006). Además, la activación microglial es un proceso altamente regulado que a menudo precede a las reacciones de cualquier otro tipo de célula en el cerebro (Kreutzberg, 1996; Liu y col., 2011). El fenotipo y las respuestas frente a los diversos estímulos que convergen en la microglía pueden diferir entre poblaciones microgliales, ya que las regiones del SNC se diferencian, por ejemplo, por los neurotransmisores presentes o las propiedades de la BHE. Así, las características de vigilancia y

la interpretación de los estímulos ambientales podrían diferir entre subconjuntos microgliales que probablemente posean distinta configuración funcional (Schwartz y col., 2006), lo que podría ser un rasgo decisivo en cuanto al rol funcional de estas células frente a distintos estímulos y patologías del SNC.

Numerosas evidencias demuestran que la transición del estado de reposo al estado de activación *in vivo* se acompaña de marcados cambios morfológicos (figura 5) y en el patrón de expresión de genes. Así, la microglía puede reducir la complejidad de su morfología retrayendo sus procesos hacia el cuerpo celular hasta adoptar una morfología ameboide totalmente activada con función fagocítica, favorecer la formación de protrusiones que le otorgan capacidad de motilidad y locomoción en el tejido, y atravesar por etapas intermedias evidenciando un característico estado de hiper-ramificación (Streit y col., 1999; Walker y col., 2013, 2014). Estos cambios morfológicos han sido correlacionados con distintos estados funcionales (Streit y col., 1988) que comprenden un amplio repertorio de cambios inmunológicos, proliferación y migración celular (Kreutzberg, 1996). En estas condiciones, las células microgliales reaccionan liberando factores neurotróficos y moléculas inmunomoduladoras que incluyen distintos tipos de mediadores inflamatorios, pro o anti-inflamatorios, como citoquinas, prostaglandinas, quimioquinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Los gradientes quimiotácticos no sólo permiten el desplazamiento activo de la microglía a una lesión o foco infeccioso, sino también orquestan la infiltración de células periféricas inmunes como parte de la respuesta inflamatoria.

La densidad local de células microgliales también puede aumentar por proliferación, con el fin de proporcionar más células para la defensa, protección y restauración de la homeostasis tisular. La transformación de la microglía en células potencialmente citotóxicas se produce principalmente en respuesta a una degeneración neuronal. La inducción y el reordenamiento de moléculas de expresión de superficie que favorecen las interacciones célula-célula y célula-matriz, y los cambios en proteínas intracelulares son algunos elementos que comprenden el proceso de activación.

Las células microgliales al activarse pueden actuar como células *scavenger* para quitar debris celular y destruir microorganismos invasores, promover la reparación de los tejidos por la secreción de factores de crecimiento y así contribuir a la homeostasis tisular. Por otro lado, pueden actuar en detrimento como causa o consecuencia de un daño patológico, por alteración de mecanismos regulatorios, la generación de respuestas inadaptadas o la activación excesiva y crónica (Zhang y col., 2011). Esto denota una marcada dicotomía funcional de la microglía (Aguzzi y col., 2013; Kempermann y Neumann, 2003; Kettenmann, 2007; Watkins y col., 2007; Zhang y col., 2011).

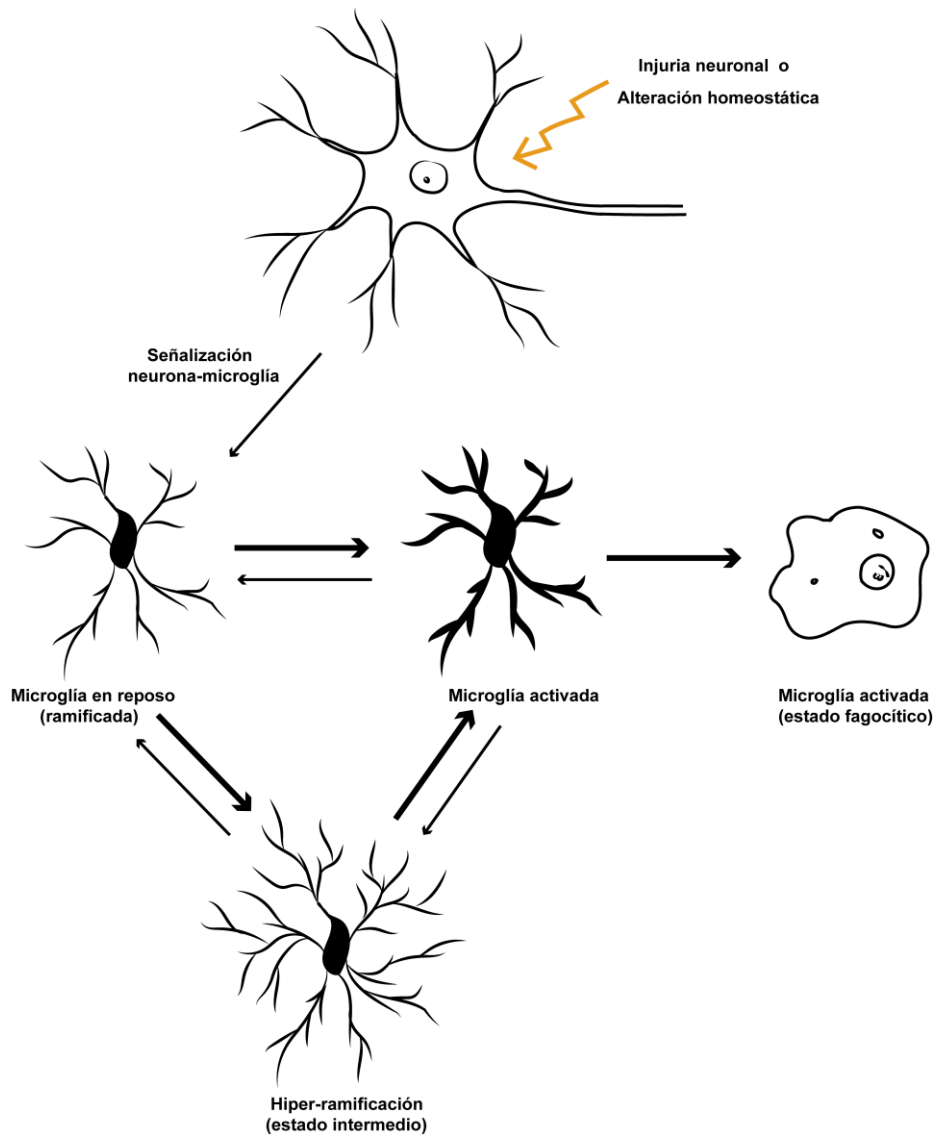


Figura 5. Cambios morfológicos observados en la microglía tras la exposición a injuria neuronal o alteración de la homeostasis tisular por una amplia variedad de estímulos. Imagen adaptada de Streit y col., 1999.

Una respuesta microglial terminada, en el mejor de los casos con éxito, puede dejar discretos rastros persistentes (Hanisch y Kettenmann, 2007). La microglía post-activada aunque puede parecer indistinguible de las células en reposo por morfología o según criterios de detección mediante inmunomarcación, sigue soportando discretos mecanismos epigenéticos a largo plazo, y puede permanecer sensibilizada por largos períodos de tiempo (Frank y col., 2011, 2012), de manera tal que ésta célula experimentada tiene el potencial para responder de manera exacerbada cuando se la expone de nuevo a un estímulo que desencadena su activación (Frank y col., 2011). Así, este evento podría contribuir un importante factor de predisposición al desarrollo de neuropatologías en las que la microglía esté involucrada. Interesantemente, se ha reportado que el estrés es capaz de sensibilizar a la microglía dejando una secuela inflamatoria

latente que sería la base para desencadenar una respuesta exacerbada frente a un estímulo inflamatorio posterior, como las drogas de abuso. Tal es así que, estas drogas serían capaces de expresar una respuesta sensibilizada modulada por la previa exposición a factores estresantes (Frank y col., 2012).

Teniendo en cuenta estas evidencias, es sumamente importante el estudio de la fisiología microglial, ya que aún no se resuelve en qué condiciones y por qué mecanismos estas células actúan previniendo o facilitando la progresión de una determinada enfermedad cerebral.

CIRCUITO DE LA MOTIVACIÓN

El circuito de la motivación juega un rol crítico en la traducción de estímulos biológicamente relevantes, tanto ambientales como farmacológicos, en respuestas motoras adaptativas (Kalivas, 1993a; Pierce y Kalivas, 1997a). Este circuito neuronal comprende numerosos núcleos cerebrales que se interconectan formando un importante circuito anatómico y funcional. Dichos núcleos cerebrales actúan en conjunto permitiendo el flujo discreto de información, codificada como disparos neuronales, desde regiones límbicas hacia los sistemas motores piramidal y extrapiramidal (Groenewegen y col., 1996; Haber, 2003; Heimer y col., 1993; Pennartz y col., 1994; Wright y col., 1996; Yin y Knowlton, 2006; Yin y col., 2008).

El sistema límbico está involucrado en los fenómenos de motivación y emoción, y el circuito motor en los fenómenos de activación y modulación de respuestas motoras a estímulos que satisfacen necesidades homeostáticas internas (Koob y Le Moal, 2008). La acción integrada y coordinada de estos dos subcircuitos determina tanto el umbral, que permite u obstruye la expresión de la respuesta motora, como la intensidad de las respuestas conductuales frente a un estímulo biológicamente relevante (Kalivas 1993a, b; Le Moal y Simon, 1991; Mogenson, 1987; Mogenson y col., 1993; Swerdlow y Koob, 1987). Esta respuesta conductual ha sido asociada a cambios en las concentraciones extracelulares de neurotransmisor y la actividad electrofisiológica en los núcleos que conforman el circuito de la motivación (Mark y col., 1991; Post y col., 1992).

La figura 6A muestra el patrón de interconexiones entre las regiones que conforman el circuito de la motivación. Brevemente, la Amígdala inerva preferentemente al ATV, el compartimento shell de NAc y al área ventromedial del Pálido Ventral (PV). Estos tres subnúcleos están recíprocamente interconectados, pero no tienen conexión directa con el sistema motor (Heimer y col., 1993; Wright y col., 1996). Para acceder al núcleo que regula la actividad motora, el ATV proyecta al NAc core y a la región dorsolateral del PV, que se encuentran interconectados con el sistema motor extrapiramidal vía Sustancia Nigra (SNigra) (Heimer y col., 1993; Kalivas y col., 1993a, Mogenson y col., 1985). Además, el área

ventromedial del PV proyecta al Tálamo medial dorsal que inerva a la CPf dorsal. A su vez, la CPf dorsal prelímbica proyecta preferentemente al compartimento core de NAc como así también a la SNigra (Sesack y col., 1989). El Tálamo medial dorsal permite el flujo de información al sistema extrapiramidal, vía interconexión con la CPf.

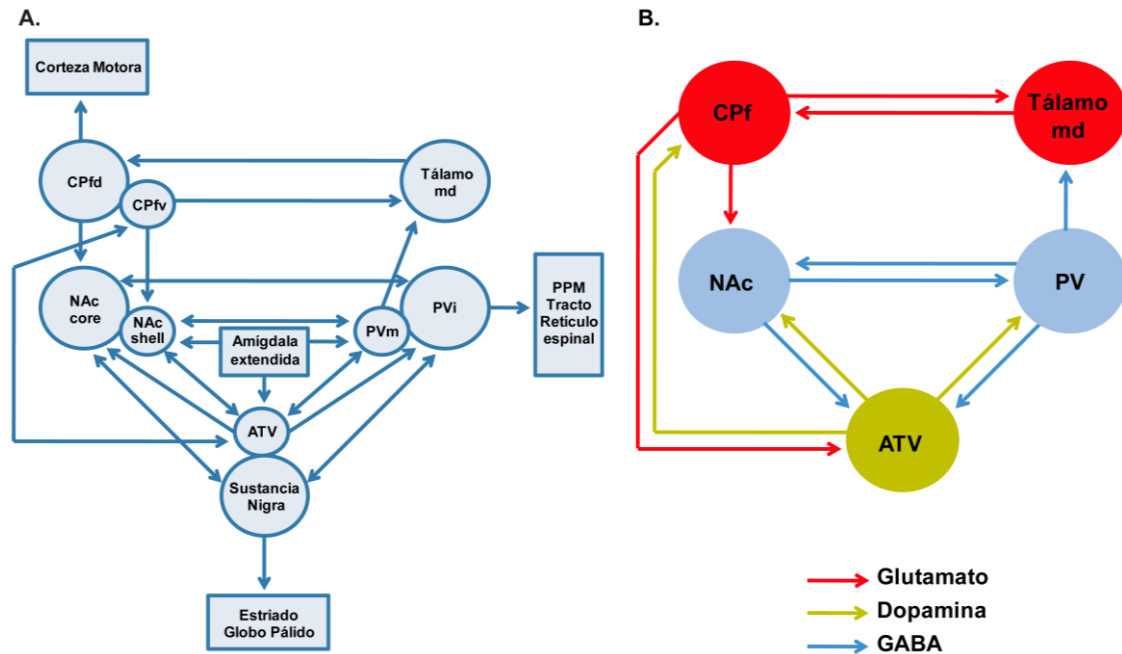


Figura 6. Circuito de la motivación. Imagen adaptada de Pierce y Kalivas, 1997a. A) Topografía de las interconexiones entre las regiones cerebrales que conforman el circuito e ilustra cómo la información puede progresar desde el sistema límbico a los sistemas motores piramidales y extra-piramidales. B) Versión simplificada del circuito y las neurotransmisiones principalmente involucradas en el circuito. Tálamo md: Tálamo dorsal medial, PV: Pálido Ventral, ATV: Área Tegmental Ventral, CPfv: Corteza Prefrontal ventral, CPfd: Corteza Prefrontal dorsal.

Entre las neurotransmisiones que dominan principalmente este circuito podemos citar las transmisiones glutamatérgicas, dopaminérgicas, gabaérgicas (figura 6B) y el sistema opioide. Las regiones cerebrales que conforman el sistema límbico, entre ellas la Amígdala, el Hipocampo y la CPf medial, envían proyecciones glutamatérgicas hacia NAc, estimulando todos los subtipos neuronales de esta área cerebral (Pierce y Kalivas, 1997a; Vanderschuren y Kalivas, 2000). Las neuronas gabaérgicas de NAc envían proyecciones al PV, ATV y SNigra. Tanto ATV como SNigra inervan el Tálamo dorsal medial y éste último envía proyecciones glutamatérgicas hacia CPf cerrando el circuito. Además, ATV envía proyecciones dopaminérgicas hacia NAc, Amígdala, CPf, PV y el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) (Pierce y Kalivas, 1997a). Las vías dopaminérgicas (mesocorticolímbica y nigroestriatal) que conforman el circuito han sido asociadas con la función motora, y son responsables de la iniciación y el mantenimiento de las respuestas conductuales frente a

reforzadores naturales y los efectos psicoestimulantes de las drogas de abuso (Pierce y Kalivas, 1997a, b).

Es importante destacar que aunque la organización anatómica del circuito favorece el flujo de información de las regiones límbicas a las motoras, el procesamiento paralelo y simultáneo de la información permite no sólo que las regiones límbicas influyan en conductas motoras aprendidas, sino también que las regiones motoras influyan en el procesamiento de nueva información en el circuito límbico (Balleine y col., 2009; Yin y col., 2008; Yin y Knowlton, 2006).

Núcleo Accumbens: Organización estructural y funcional

Dentro del circuito de la motivación, el NAc es una de las estructuras donde convergen una gran variedad de vías neurales que conforman este circuito. Esta estructura cerebral forma parte del estriado ventral y es considerada el sitio de interfase límbico-motor (Mogenson y col., 1980), cuyo principal rol neurobiológico es la modulación de la transferencia de información motivacionalmente relevante y de importancia adaptativa para que sea codificada en una respuesta motora (Koob y Le Moal, 1997; Wolf, 2002). Numerosos estudios neurobiológicos han resaltado su destacado rol en el desarrollo de respuestas motoras tras estímulos tanto apetitivos como aversivos y su participación en diversos procesos como la ingesta de reforzadores naturales, la conducta sexual, la recompensa, la autoadministración de drogas, la respuesta al estrés, entre otras (Abercrombie y col., 1989; Damsma y col., 1992; Groenewegen y col., 1996; Maldonado-Irizarry y col., 1995; Robbins y Koob, 1980; Schultz y col., 1992).

El NAc se compone de múltiples tipos de células neuronales. El 95% de las neuronas corresponden a neuronas espinosas medianas (MSNs) gabaérgicas, que se diferencian entre aquellas que expresan receptores dopaminérgicos D1 junto con dinorfina y sustancia P, y las que expresan receptores dopaminérgicos D2 junto con encefalina. Cerca del 1-2% de las neuronas de NAc son interneuronas colinérgicas no espinosas, y un número similar corresponde a interneuronas gabaérgicas.

Las aferencias excitatorias glutamatérgicas que llegan a NAc desde áreas límbicas y corticales son moduladas por aferentes dopaminérgicas provenientes de ATV, y por los péptidos opioides endógenos que son expresados a nivel local y también liberados por aferencias neuronales provenientes de otras áreas cerebrales. Los cannabinoides también tienen un papel regulador dentro de NAc, actuando principalmente a nivel local por inhibición de la funcionalidad de las sinapsis glutamatérgicas (Robison y Nestler, 2011).

El NAc está subdividido en dos compartimentos funcionalmente distintos, llamados NAc core y NAc shell (Heimer y col., 1991; Kelley, 2004b; Pennartz y col., 1994).

El NAc shell, cercano a la Amígdala extendida, presenta conexiones de carácter “límbico”. Está fuertemente interconectado con el Hipotálamo y el ATV; e involucrado en la regulación de la conducta de ingesta (Kelley, 2004b; Robinson y Berridge, 1993), la motivación y el reforzamiento (Di Chiara e Imperato, 1998). Recibe importantes aferencias tanto glutamatérgicas desde el Hipocampo, CPf infralímbica y la Amígdala centromedial, como dopaminérgicas desde el ATV a través del haz mesolímbico. Esta inervación dopaminérgica recíproca desde el ATV hacia NAc shell es importante para modular la saliencia motivacional y contribuye a establecer asociaciones aprendidas entre eventos motivacionales y estímulos ambientales concurrentes (Bassareo y Di Chiara, 1999; Sellings y Clarke, 2003).

El NAc core está relacionado anatómicamente y funcionalmente al estriado dorsal, cíngula anterior y corteza orbitofrontal, e involucrado en la integración sensorio-motora (Zahm y Brog, 1992). Así, este compartimento parece ser el sitio primario que media la expresión de conductas aprendidas en respuesta a los estímulos que predicen eventos motivacionales relevantes (Di Ciano y Everitt, 2001; Kelley, 2004b). Recibe aferencias glutamatérgicas de la CPf prelímbica y dopaminérgicas de la SNigra, y presenta conexiones gabérgicas eferentes hacia el PV que forman parte de los bucles motores córtico-estriado-pálido-talámicos de carácter extrapiramidal (Pierce y Kalivas, 1997a).

NAc core y NAc shell se interconectan indirectamente mediante la CPf. El patrón de conexiones CPf -NAc es crítico para la actividad neurofisiológica de NAc. Parece ser que la CPf actúa como “enlace” entre ambos compartimentos de NAc (Vanderschuren y Kalivas, 2000). La información de salida de Shell se dirige a la región ventromedial del PV, el cual inerva el núcleo dorsomedial del Tálamo. Éste núcleo envía, de modo casi específico, fibras hacia la CPf prelímbica dorsal, la cual, a su vez, proyecta fibras glutamatérgicas al Core (Heimer y col., 1991; Meredith y col., 1992).

La participación indispensable de NAc en la expresión de conductas adaptativas no depende de las aferencias dopaminérgicas, sino de las aferencias glutamatérgicas de la CPf (Di Ciano y col., 2001). Aunque no es un evento obligatorio, la dopamina se libera en el NAc en respuesta a los estímulos que predicen un evento gratificante y probablemente modula la expresión de las conductas adaptativas (Cheng y col., 2003; Ito y col., 2000).

La relación NAc core y CPf con la actividad motora ha sido confirmada por experimentos electrofisiológicos durante la autoadministración de cocaína y heroína, los cuales demostraron una clara relación entre la actividad neuronal en estas regiones cerebrales y la conducta de administración de drogas (Chang y col., 1994, 1996, 1998). En apoyo a estas evidencias, se ha demostrado que la proyección glutamatérgica de CPf prelímbica a NAc core tiene un papel preponderante en la conducta de búsqueda de la droga (McFarland y col., 2003). Estos hallazgos han sugerido la hipótesis de que las alteraciones en la transmisión

glutamatérgica que proyecta a NAc core desde CPf prelímbica, inducidas por la administración crónica de drogas, perturbarían el procesamiento de la información en el circuito cortico-estriato-talámico, favoreciendo la disminución de la capacidad de control de la conducta de búsqueda de drogas y aumentando la vulnerabilidad a la recaída al consumo de drogas (Kalivas, 2009).

Participación del circuito de la motivación en los efectos estimulantes y de recompensa de las drogas de abuso

Fisiológicamente, el circuito de la motivación asegura la supervivencia de las especies al asociar funciones vitales con un estado emocional positivo. Este circuito evolutivamente conservado se activa por estímulos tales como alimentación, sexo y estimulación social. Estos estímulos conocidos como reforzadores naturales, son capaces de incrementar la liberación de dopamina en NAc provocando una sensación placentera. Así, el rol fisiológico de esta respuesta es mantener al individuo focalizado en actividades que promueven la supervivencia y la reproducción.

Las drogas de abuso mediante diferentes mecanismos de acción usurpan este circuito y activan, de manera directa o indirecta, la neurotransmisión dopaminérgica (Koob y Le Moal, 1997; Koob y Nestler, 1997; Nestler, 2005), mecanismo que comparten con los reforzadores naturales, pero a diferencia de estos, lo hacen de una manera más intensa y persistente, sin estar asociados a respuestas conductuales productivas. Así, a pesar de la diferencia en su estructura molecular y el mecanismo por el cual ejercen su acción, la administración repetida de drogas tales como alcohol, nicotina, opiáceos, cannabinoides y psicoestimulantes producen una desregulación del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico generando un aumento en los niveles extracelulares de dopamina en NAc (Di Chiara y col., 1993a). El incremento de la actividad dopaminérgica a nivel de la vía mesocorticolímbica constituye un evento clave que explica el efecto reforzante de las drogas de abuso y media la activación psicomotora inducida por los psicoestimulantes (Kalivas y Duffy, 1990).

SENSIBILIZACIÓN

Las primeras teorías postuladas para explicar el desarrollo de la adicción sugieren que la conducta adictiva se desarrolla debido al efecto placentero que inicialmente producen las drogas de abuso, y que la dependencia se produce en función de un impulso recurrente conducido por el efecto reforzante de las drogas (Wise, 1980). Aunque este fenómeno denominado reforzamiento positivo está implicado en estadios iniciales del proceso adictivo, el abuso de

drogas a largo plazo a menudo da lugar a efectos psicológicos y fisiológicos aversivos si se retira la droga, lo que conduce al consumo como medio para evitar las consecuencias negativas asociadas al síndrome de abstinencia de la droga, lo que se conoce como reforzamiento negativo (Cami y Farre, 2003). Así, se ha postulado que las conductas adictivas incluyen un cambio gradual del consumo por reforzamiento positivo (impulsividad) al consumo por reforzamiento negativo (compulsividad) (Koob, 2004; Koob y Volkow, 2010).

Aunque el reforzamiento positivo y negativo desempeñan un papel en la iniciación y el mantenimiento de las conductas adictivas, respectivamente, y por lo tanto pueden explicar algunos aspectos de la persistencia del trastorno (Markou y col., 1993; Wilker, 1973), estas teorías no explican aspectos característicos como el complejo patrón conductual de recaída al consumo, que incluye la búsqueda y consumo compulsivo de drogas, después de un período prolongado de abstinencia cuando los síntomas evidentes del síndrome de abstinencia se han disipado.

Por ello, se ha propuesto abordar el estudio de la adicción a partir del concepto de sensibilización incentivo-motivacional ("*incentive-sensitization*"; Robinson y Berridge, 1993, 2001; Berridge y Robinson, 1995), el cual postula que la sensibilización producida por las drogas genera una atribución excesiva de la saliencia motivacional (*incentive-saliency*) responsable de los patrones compulsivos de búsqueda y consumo de la droga. Ésta teoría propone que las drogas de abuso alteran a largo plazo los núcleos cerebrales que componen el circuito de la motivación. Estas neuroadaptaciones son críticas ya que vuelven al circuito neuronal hipersensible a las drogas y a los estímulos asociados a ella. Tal es así, que la sensibilización no es una consecuencia inevitable de la exposición repetida a las drogas, sino que la capacidad de los sistemas neurales sensibilizados para obtener el control sobre la conducta, está constantemente y fuertemente modulada por los estímulos ambientales que han sido asociados con la administración de la droga (Robinson y col., 1998). Importantly, la persistencia en el tiempo de estas neuroadaptaciones, incluso meses y años (Paulson y col., 1991; Robinson y Becker 1986), contribuiría a la naturaleza duradera del estado adictivo. De este modo, la base neural de la sensibilización modulada por los estímulos contextuales sería la responsable de la sensibilización psicomotora, la facilitación de la conducta de autoadministración, la búsqueda y consumo compulsivo de drogas, e incluso de la recaída tiempo después de la interrupción del consumo de la droga dada por la persistencia característica del fenómeno (Anagnostaras y Robinson, 1996; Robinson y Berridge, 2000). Así, la importancia de la comprensión de los mecanismos neuroadaptativos que subyacen a la sensibilización, radica en el rol potencial que tiene este fenómeno sobre el desarrollo de la adicción, así como sobre la reincidencia al consumo después de largos períodos de abstinencia (Robinson y Berridge, 1993).

El fenómeno de sensibilización se divide anatómicamente y temporalmente en dos fases denominadas inducción y expresión (Kalivas y Stewart, 1991; Pierce y Kalivas, 1997a).

Inducción y expresión de la sensibilización

La inducción de la sensibilización se define como la secuencia transitoria de eventos celulares y moleculares precipitados por la administración de psicoestimulantes que conduce a cambios duraderos en la función neural responsable de la alteración conductual (Pierce y Kalivas, 1997a). La fase de inducción de la sensibilización se produce en ATV (Kalivas, 1995), sitio en el mesencéfalo ventral donde se encuentran los somas de neuronas dopaminérgicas que dan lugar a la vía mesocorticolímbica (Fallon y Moore, 1978).

La expresión se define como las alteraciones neurales duraderas que surgen del proceso de iniciación que directamente median una respuesta conductual a la droga potenciada y persistente. En contraste, los eventos neuronales asociados con la expresión se distribuyen entre los núcleos interconectados del circuito de la motivación, siendo una de las áreas más relevantes para la expresión, el NAc (Pierce y Kalivas, 1997a).

Importantemente, la separación anatómica de ambos eventos pone de manifiesto la transferencia de información desde ATV a NAc. Se ha reportado una marcada dependencia temporal de la expresión de la sensibilización y las neuroadaptaciones asociadas. Tras el cese de la administración de la droga, durante la abstinencia a corto plazo (días posteriores al tratamiento), se producen diversas neuroadaptaciones que se disipan con el tiempo. En general, se piensa que estas adaptaciones transitorias son necesarias para evocar adaptaciones duraderas (semanas a meses después del tratamiento), que median la persistencia de la hipersensibilidad de los circuitos neuronales a las drogas (Pierce y Kalivas 1997a; Steketee y Kalivas, 2011; Vanderschuren y Kalivas, 2000; White y col., 1995; White y Kalivas 1998; Wolf, 1998).

Sensibilización conductual

Una de las formas de poner en evidencia el proceso neuroadaptativo de sensibilización neural es mediante la sensibilización conductual. Este fenómeno hace referencia al aumento progresivo y duradero de la respuesta conductual ante un estímulo (ejemplo, la administración de un psicoestimulante) que ocurre luego de exposiciones repetidas al mismo (Kalivas y Stewart, 1991; Robinson y Becker, 1986). La respuesta conductual comúnmente evaluada es la actividad locomotora.

Entre las características más sobresalientes de la sensibilización psicomotora se ha reportado que es un fenómeno dosis dependiente (Browman y col., 1998a, b; Kalivas y col.,

1988) y tras la interrupción del tratamiento suele ser más evidente a largo plazo que a corto plazo (Antelman, 1988). Además, suele observarse de manera robusta cuando se administran drogas en forma repetida e intermitente (Post, 1980, Robinson y Becker, 1986) y cuando la re-exposición a la droga, durante la fase de expresión, se produce en el mismo ambiente que la exposición previa durante la fase de inducción (Anagnostaras y Robinson, 1996; Mattson y col., 2008; Vezina y col., 1989; Vezina y Leyton, 2009; Wang y Hsiao, 2003).

Una gran variedad de factores contribuyen a la variabilidad individual de la susceptibilidad a la sensibilización y pueden afectar la fuerza de la sensibilización conductual, incluidos el número de tratamientos, intervalo entre tratamientos, dosis, sexo, edad, factores genéticos, hormonales y la experiencia previa (Antelman y col., 1980; Post y Contel, 1983; Robinson, 1988; Shuster y col., 1977). Incluso, se ha reportado que la exposición repetida a psicoestimulantes puede producir sensibilización en humanos (Angrist, 1994; Post y Contel, 1983; Sato, 1986; Sato y col., 1983; Segal y Schuckit, 1983).

Numerosos estudios en modelos animales han reportado sensibilización conductual en respuesta a cocaína, anfetamina, morfina, etanol, nicotina y $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol (Benwell y Balfour, 1992; Cadoni y col., 2001; Cunningham y Noble, 1992; Joyce e Iversen, 1979; Post y col., 1992; Robinson y Becker, 1986), fenómeno que podría jugar un rol importante en la escalada de consumo de droga. Por otro lado, diversos laboratorios han revelado el desarrollo de “sensibilización cruzada” entre drogas de distintas características farmacológicas. Por ejemplo, animales que fueron tratados crónicamente con cocaína demostraron sensibilización cruzada a las propiedades estimulante motora (McDaid y col., 2005) y reforzante (Shipenberg y col., 1998) de morfina, o animales pre-expuestos a cocaína o anfetamina desarrollaron sensibilización cruzada tanto a anfetamina como a cocaína (Kalivas y Weber 1988; Pierce y Kalivas 1995; Vanderschuren y col., 1999).

Otros estudios demostraron que animales expuestos repetidamente a $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol mostraron una respuesta conductual sensibilizada a morfina (Cadoni y col., 2001), mientras que los animales expuestos repetidamente a etanol mostraron sensibilización conductual en respuesta a cocaína y viceversa (Itzhak y Martin, 1999) y los animales expuestos repetidamente a anfetamina sensibilizaron frente a la exposición a morfina (Lett, 1989; Vezina y col., 1989; Vezina y Stewart, 1990). Además, los animales con un historial de exposición repetida a tolueno por vía inhalatoria exhibieron una respuesta sensibilizada conductual a cocaína (Beyer y col., 2001). Estas evidencias indican que las distintas drogas de abuso a pesar de ser farmacológicamente diferentes y ejercer su acción mediante distintos mecanismos, impactan sobre sustratos neuronales comunes favoreciendo el desarrollo de la sensibilización, lo que podría incrementar la vulnerabilidad a adicción en poblaciones que padecen policonsumo de drogas.

Eventos moleculares y neuroquímicos asociados a la sensibilización a drogas: participación de la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica

Numerosas adaptaciones neuroplásticas pre y postsinápticas han sido descritas en el circuito de la motivación, particularmente en NAc, en animales sensibilizados.

Con respecto al rol del sistema dopaminérgico en la sensibilización, un ejemplo de adaptación presináptica es el aumento persistente de la capacidad de diversas drogas de abuso, particularmente los psicoestimulantes, para incrementar la concentración de dopamina extracelular en NAc y estriado de animales sensibilizados (Kalivas y Stewart, 1991; Pierce y Kalivas, 1997a, b; Robinson y Berridge, 1993; Vanderschuren y col., 1999). Además de los cambios en la liberación de dopamina, la unión de la dopamina a sus receptores juega un papel clave en la sensibilización conductual. Por ejemplo, el aumento de la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas de ATV tras la administración repetida de cocaína ha sido asociado con la disminución de la sensibilidad de los autoreceptores de dopamina D2 (Henry y col., 1989; White y Wang, 1984). Entre los ejemplos de adaptaciones postsinápticas cabe citar un aumento de la sensibilidad de los receptores de dopamina D1 (Henry y White, 1991; White y Kalivas, 1998).

Estudios mediante técnicas electrofisiológicas han demostrado que la administración no contingente aguda o repetida de drogas de abuso, incluidas cocaína, amfetamina, etanol, morfina y nicotina, inducen LTP de las neuronas dopaminérgicas de ATV mediante un mecanismo dependiente de glutamato (Saal y col., 2003; Ungless y col., 2001). La excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas de ATV inducida por glutamato, observada en animales que evidenciaron sensibilización conductual, involucra la participación de receptores AMPA (Zhang y col., 1997). En este sentido, estudios reportaron que el LTP inducido por cocaína sería el resultado de la inserción de receptores AMPA que carecen de la subunidad GluR2 en la superficie de la membrana postsináptica (Argilli y col., 2008; Bellone y Lüscher, 2005; Mameli y col., 2007).

En contraste con lo que ocurre en ATV, la abstinencia a cocaína, tras la administración no contingente repetida del psicoestimulante, ha sido asociada a una reducción de los niveles basales de glutamato en NAc, mientras que la expresión de la sensibilización conductual, evidenciada mediante la inyección i.p. de la droga, ha sido asociada a un aumento de la liberación de glutamato en esta región cerebral (Pierce y col., 1996; Reid y Berger, 1996). Al igual que lo que ocurre en NAc (Pierce y col., 1996), la administración de cocaína sólo incrementa los niveles de glutamato en CPf medial en los animales que expresan sensibilización conductual a cocaína (Williams y Steketee, 2004). Los reducidos niveles de glutamato basal observados en animales sensibilizados parecen permitir una mayor liberación de glutamato en

respuesta a una dosis desafío de la droga y, consecuentemente, la expresión de la sensibilización conductual. Este mecanismo estaría mediado por la disminución de la función y expresión de receptores mGluR2/3 tras la administración repetida de cocaína. De este modo, la alteración del tono inhibitorio de estos receptores sobre la liberación de glutamato, favorecería la transmisión glutamatérgica en esta región cerebral (Xi y col., 2002). En apoyo a estas evidencias, el restablecimiento de los niveles de glutamato basal con NAC impidió la expresión de la sensibilización conductual (Madayag y col., 2007).

Otros estudios demostraron que la sensibilización tanto a anfetamina como a cocaína también va acompañada de modificaciones estructurales persistentes en la morfología de espinas dendríticas en NAc y CPf (Robinson y Kolb, 1997, 1999). Dichas alteraciones estructurales están críticamente asociadas a cambios en el tráfico de receptores AMPA de superficie a nivel postsináptico (Wolf y Ferrario, 2010). Así por ejemplo, luego de la exposición a dosis repetidas de cocaína, seguida de un período prolongado de abstinencia, se observa un incremento en los niveles de expresión de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA y la subunidad NR2B de los receptores NMDA en NAc de animales que desarrollaron sensibilización a cocaína (Boudreau y col., 2007, 2009; Boudreau y Wolf, 2005; Churchill y col., 1999). Estas y otras evidencias han permitido sugerir que la plasticidad en las sinapsis glutamatérgicas dependiente de la experiencia subyace a la sensibilización conductual.

Impacto del estrés y las drogas de abuso sobre sustratos neurobiológicos comunes

A partir del fenómeno de sensibilización cruzada entre drogas de abuso de distintas características farmacológicas, se desprende el concepto de sensibilización cruzada a un psicoestimulante inducida por la exposición a estrés agudo o crónico, la cual se manifiesta luego de una dosis aguda del psicoestimulante (Kalivas y Stewart, 1991). Estudios de nuestro y otros laboratorios reportaron que animales previamente expuestos a distintos paradigmas de estrés agudo o crónico como estrés por derrota social, restricción de movimiento, restricción de comida o estrés crónico variable evidenciaron sensibilización cruzada a cocaína (Boyson y col., 2011, 2014; Esparza y col., 2012; García-Keller y col., 2013, 2016) y anfetamina (Deroche y col., 1995; Kōiv y col., 2019; Pacchioni y col., 2007), lo que sugiere que tanto el estrés como las drogas de abuso impactan sobre sustratos neurales comunes.

De manera similar a las drogas de abuso, la exposición a estrés también es capaz de influenciar la conducta como resultado de su habilidad para incrementar la liberación de dopamina en NAc, efecto que fue observado en animales luego de ser expuestos a distintos tipos de estímulos estresantes de manera aguda o crónica (Brodnik y col., 2017; Deroche y col., 1995; Kalivas y Stewart, 1991; Kippin y col., 2008; Rouge-Pont y col., 1995; Sorg y Kalivas, 1991).

Se cree que el CRF y los glucocorticoides, hormonas liberadas durante eventos estresantes, son un punto crítico entre las respuestas conductuales y fisiológicas del estrés y las drogas de abuso (Koob, 1999; Koob y Zorrilla, 2010; Shaham y col., 2000). Se ha reportado que el CRF juega un rol clave en el consumo de drogas y la reinstalación de la conducta de búsqueda de la droga inducida por estrés al modular la actividad neuronal mediante su acción sobre los receptores de CRF tipo 1 y 2 (CRFR1 y CRFR2) expresados en regiones cerebrales involucradas en la adicción a drogas (Black-top y col., 2011; Boyson y col., 2011, 2014; Wang y col., 2005).

La función principal del CRF es activar el eje HHA aumentando la liberación de glucocorticoides en respuesta a estrés (Bale y Vale, 2004). Además de este eje, los axones que liberan CRF se proyectan hacia zonas extrahipotálmicas, entre ellas Amígdala, BNST y ATV (Sawchenko y col., 1993; Swanson y col., 1983). Las neuronas dopaminérgicas de ATV y sus amplias proyecciones a áreas como NAc, CPf y Amígdala, que juegan un papel central en las respuestas agudas y crónicas a las drogas de abuso (Spanagel y Weiss, 1999), pueden representar un importante sitio de interacción entre la exposición a estrés y el abuso de drogas, ya que los estímulos estresantes o las infusiones intracerebroventriculares (i.c.v.) de CRF, aumentan la liberación de dopamina en áreas de proyección límbica y cortical (Dunn y Berridge, 1987; Koob y Heinrichs, 1999). En apoyo a estos hallazgos, se ha demostrado que CRF en ATV es capaz de producir cambios neuroadaptativos en neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica (Saal y col., 2003) vía CRFR1 (Wanat y col., 2008).

Las neuronas dopaminérgicas de ATV se encuentran bajo un importante control glutamatérgico, y la modulación de estas sinapsis participa en los cambios de la actividad dopaminérgica a corto y largo plazo (Bonci y Malenka, 1999). Se ha reportado que CRF en ATV potencia la transmisión excitatoria en neuronas dopaminérgicas en animales previamente expuestos de manera repetida a cocaína (Hahn y col., 2009).

Siguiendo la hipótesis de mecanismos comunes entre drogas de abuso y estrés, se ha demostrado que la administración *in vitro* de CRF en ATV induce la potenciación de la transmisión sináptica mediada por el receptor NMDA en las neuronas dopaminérgicas del ATV vía CRFR2, sugiriendo que la transmisión glutamatérgica también sería un sitio blanco de acción tanto para las drogas de abuso como para el estrés (Ungless y col., 2003). Estudios posteriores del mismo laboratorio reportaron que la potenciación de la transmisión excitatoria en VTA, mediada por receptores AMPA en respuesta a CRF, sería la responsable de incrementar la actividad dopaminérgica en el sistema mesocorticolímbico (Ungless y col., 2010).

Además, estudios mediante técnicas electrofisiológicas han reportado un aumento de la fuerza sináptica, evidenciado por un incremento en la relación de las corrientes AMPA/NMDA en neuronas dopaminérgicas de ATV, en respuesta a estrés agudo y la administración *in vivo* de

drogas que poseen diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción tales como cocaína, nicotina, anfetamina, morfina y etanol (Saal y col., 2003). En última instancia, la modulación excitatoria de las neuronas dopaminérgicas de ATV puede verse potenciada aún más mediante la atenuación de la modulación inhibitoria de los receptores de dopamina D2 y GABA-B inducida por el CRF (Beckstead y col., 2009).

El estrés no sólo tiene la habilidad de incrementar las concentraciones extracelulares de glutamato al inducir su liberación sináptica en ATV, sino también en áreas como CPf medial, Estriado y NAc (Moghaddam, 1993). Consistentemente, se ha demostrado que la administración aguda o crónica de psicoestimulantes induce un aumento en la liberación de glutamato en ATV y NAc (Kalivas y Duffy, 1995; Reid y Berger, 1996; Reid y col., 1997). Así, estos eventos estarían mediados por las proyecciones glutamatérgicas desde CPf y Amígdala hacia estructuras subcorticales, incluyendo ATV y NAc (Groenewegen, 1999; Sesack y col., 1989; Wright y col., 1996). Interesantemente, la interacción entre glutamato y dopamina a nivel sináptico en NAc (figura 7) ha sido demostrada mediante estudios ultraestructurales anatómicos de NAc, los cuales han demostrado que ciertas proyecciones glutamatérgicas provenientes de CPf prefrontal y proyecciones mesencefálicas dopaminérgicas, en cercana aposición entre ellas, forman contactos sinápticos en neuronas de NAc (Sesack y Pickel, 1990, 1992).

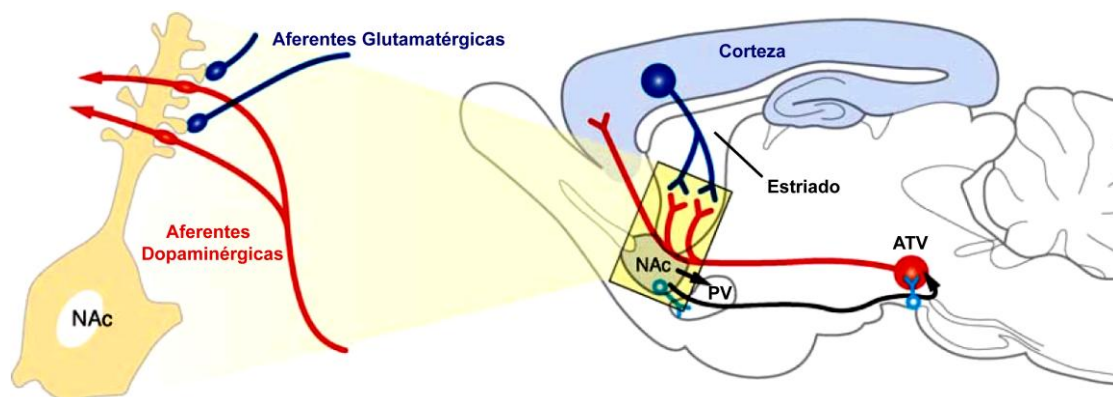


Figura 7. Aferentes glutamatérgicas desde Corteza cerebral y dopaminérgicas desde ATV o SNigra hacia NAc. Ambas proyecciones aferentes interactúan en NAc. Como se observa en la figura, las aferentes glutamatérgicas hacen sinapsis en las cabezas de las espinas dendríticas de las MSNs. Las aferentes dopaminérgicas hacen sinapsis en los cuellos de las espinas, lo que las posiciona idealmente para modular la transmisión glutamatérgica aferente. Imagen adaptada de Hyman y col., 2006.

Una de las importantes implicancias mecánísticas de la activación de la transmisión glutamatérgica cortical inducida por estrés en la vulnerabilidad a la adicción es que puede mediar el efecto del estrés sobre el sistema dopaminérgico (Moghaddam, 1993, 2002). Este

último sistema, a nivel de NAc, media los efectos estimulante motor y reforzante de los psicoestimulantes, los cuales son críticos para el potencial abuso de una droga.

En conjunto, estos datos proporcionan la base neurofisiológica de la interacción de los sistemas dopaminérgico y glutamatérgico a nivel mesocorticolímbico, y sugieren que la sensibilización conductual inducida por drogas o estrés está asociada a un incremento de la actividad de la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica, particularmente mediada por cambios adaptativos pre y postsinápticos en NAc. Dichos cambios están implicados en el aumento de la excitabilidad neuronal en NAc y serían, en parte, la base neural de la sensibilización conductual.

Sensibilización y reforzamiento

Si bien la sensibilización psicomotora es un modelo sumamente útil que permite poner en evidencia los cambios neuroadaptativos inducidos por la administración repetida de drogas, sólo provee una evidencia indirecta de la sensibilización a los efectos incentivo-motivacionales y reforzantes de las drogas de abuso (Robinson y Berridge, 2001).

La evidencia más directa de que el efecto de recompensa de las drogas está mediado por la sensibilización del circuito neural que subyace al fenómeno de sensibilización proviene de estudios enfocados en la neurobiología de la sensibilización y estudios realizados en modelos animales de autoadministración y preferencia condicionada a un sitio. Dichos estudios postulan que el efecto reforzante de las drogas estaría mediado por neuroadaptaciones en la transmisión dopaminérgica mesocorticolímbica (Kalivas y Stewart, 1991; Robinson y Berridge, 1993; Pierce y Kalivas, 1997a; White y Kalivas, 1998; Wolf, 1998). Estos últimos demuestran que no sólo los efectos estimulantes motores de las drogas sensibilizan, sino también sus efectos reforzantes, ya que la exposición previa a una variedad de drogas potencialmente adictivas facilita la adquisición posterior de la conducta de autoadministración de drogas (Piazza y col., 1989, 1990) o de preferencia condicionada a un sitio (Shippenberg y col., 1998).

Sensibilización conductual y autoadministración de drogas

La participación de la sensibilización en la autoadministración de drogas suele estar determinada por la capacidad de la exposición repetida a drogas de manera no contingente para facilitar la adquisición de la administración contingente de drogas, utilizando dosis bajas de las mismas (Piazza y col., 1989, 1990; Vezina, 2004), o por la autoadministración de drogas que induce la sensibilización locomotora en respuesta a una inyección no contingente de la droga (Vezina, 2004).

El modelo de sensibilización conductual es uno de los modelos experimentales más estudiados y utilizados para abordar el estudio de la adicción. Permite identificar los sustratos neurobiológicos que subyacen al proceso adictivo y a la interacción entre estrés y drogas. Sin embargo, el modelo más válido para abordar este estudio es el paradigma de autoadministración de drogas ya que es el que más se asemeja a la condición humana dado que imita de manera precisa el fenómeno que se desea estudiar (Spanagel, 2017). La diferencia entre ambos modelos experimentales radica en que el modelo de sensibilización, involucra la administración no contingente de la droga al animal suministrada por un operador, mientras que el modelo de autoadministración involucra la administración contingente de la droga donde el propio animal regula la administración de la misma. En este último modelo se ponen en juego patrones de compulsión y búsqueda de la droga, como también la compleja interacción de numerosas áreas neurales involucradas en el desarrollo de ambos patrones conductuales.

La autoadministración es un complejo paradigma basado en el análisis conductual utilizando programas de reforzamiento (*Schedule reinforcement*) establecidos por Ferster y Skinner (1957). Este paradigma está basado en el concepto de condicionamiento operante, un tipo de aprendizaje asociativo en el que la conducta se produce en función de sus consecuencias (Schuster y Thompson, 1969). Los enfoques modernos para estudiar este tipo de condicionamiento incluyen respuestas operantes (por ejemplo, la presión de una palanca) que conducen a la entrega de un reforzador. Así por ejemplo, los animales se colocan en cajas de conducta operante donde la presión de una palanca se acompaña de la entrega de una droga por vía intravenosa u oral. Por lo general, en los modelos de autoadministración se utilizan esquemas de razón fija (FR), lo que requiere que el animal presione la palanca un número fijo de veces antes de la entrega de la droga, aunque alternativamente pueden emplearse otros programas como razón progresiva (PR).

El paradigma de autoadministración puede utilizarse para modelar diversos componentes del uso de drogas en los seres humanos, entre ellos: 1) la adquisición de la conducta, usualmente empleada para estudiar los primeros encuentros con la droga o estadios iniciales de la adicción y la influencia de factores de vulnerabilidad a la adicción, 2) el mantenimiento para evaluar el consumo regular estable de la droga, 3) la escalada de consumo que permite estudiar el aumento progresivo del uso de la droga, 4) la retirada de la droga con o sin extinción de la conducta para estudiar la abstinencia de la droga y 5) la reinstalación de la conducta de búsqueda de la droga inducida por claves, estrés o drogas que permiten el estudio de la recaída al consumo (Scofield y col., 2016a).

HIPÓTESIS DE LA HOMEOSTASIS DE GLUTAMATO EN LA ADICCIÓN A DROGAS

Si bien los efectos reforzantes agudos de las drogas adictivas están mediados por el incremento en la actividad de la transmisión dopaminérgica mesocorticolímbica, lo cual es fundamental para el inicio de la adicción ya que refuerza el aprendizaje y la conducta de consumo (Berridge y Robinson, 1998; Kelley, 2004a) transformando progresivamente el consumo en búsqueda compulsiva de la droga (Cardinal y Everitt, 2004; Kelley, 2004a); el mantenimiento de la adicción y la persistente vulnerabilidad a la recaída, en ausencia de la administración repetida de la droga, resultan principalmente de las adaptaciones celulares en la proyección glutamatérgica desde CPf a NAc (Kalivas y Volkow, 2005; Kalivas, 2009). Estos cambios plásticos reducen la capacidad de la CPf para iniciar conductas en respuesta a reforzadores naturales, disminuye el control cognitivo sobre la conducta y promueven el carácter compulsivo de la búsqueda de droga. Simultáneamente, la CPf es responsable de interpretar los estímulos que predicen la disponibilidad de la droga, lo que resulta en un incremento de la actividad glutamatérgica en NAc en respuesta a estímulos asociados a la misma. Así, las sinapsis excitatorias pierden la capacidad de regular la neurotransmisión en NAc (Kalivas y Volkow, 2005). En apoyo a estas evidencias, la activación de la proyección glutamatérgica desde CPf prelímbica a NAc core ha sido asociada a la iniciación de conductas motivadas aprendidas (Hyman y col., 2006).

Un estudio realizado en un modelo animal de recaída al consumo de drogas demostró que la inyección de una dosis desafío de cocaína en animales previamente expuestos a la administración crónica de cocaína, y sometidos a un protocolo de extinción, provocó el incremento de los niveles extracelulares tanto de dopamina como de glutamato en NAc core y, consecuentemente, la reinstalación de la conducta de autoadministración de cocaína. Sin embargo, cuando se administró cocaína en animales *yoked* o control salina, sólo se elevaban los niveles de dopamina. Así, se determinó que mientras la dopamina incrementaba independientemente de la conducta, el glutamato sólo aumentaba cuando los animales volvían a presionar la palanca asociada a la droga y no a un reforzador natural. Estas evidencias sugirieron que la activación de la proyección glutamatérgica desde CPf prelímbica a NAc core es necesaria para iniciar la conducta de búsqueda de droga en modelos de recaída al consumo de drogas (McFarland y col., 2003).

Estos antecedentes, en parte, han llevado a plantear la hipótesis de la homeostasis de glutamato que subyace a la adicción. Particularmente, se ha propuesto que la incapacidad de la CPf para controlar la conducta compulsiva de búsqueda de droga ha sido asociada a un desequilibrio duradero en la homeostasis de glutamato en NAc core (Kalivas, 2009).

La homeostasis glutamatérgica hace referencia a los mecanismos de regulación de los niveles de glutamato extracelular en los espacios sináptico y no sináptico que conducen al mantenimiento de la concentración de este neurotransmisor en niveles fisiológicos. Además, este término involucra la actividad sináptica, incluyendo sus componentes pre y postsinápticos, y la contribución glial a la regulación de la comunicación neuronal y los niveles de glutamato extracelular.

Un factor clave en el mantenimiento de la homeostasis glutamatérgica es el balance entre la liberación y eliminación del neurotransmisor tanto a nivel sináptico como glial (Kalivas, 2009). Así, el desequilibrio de estos mecanismos tiene como consecuencia la alteración en los niveles extracelulares de glutamato y cambios en la plasticidad sináptica que perjudican la comunicación entre aferentes glutamatérgicos prefrontales y las neuronas postsinápticas en NAc.

El glutamato extracelular está altamente compartimentalizado en el SNC. El monitoreo *in vivo* de glutamato extracelular mediante la técnica de microdiálisis o voltametría e *in vitro* mediante electrofisiología han reportado que la concentración de glutamato extracelular, fuera de la hendidura sináptica, puede modular la transmisión excitatoria sináptica y la plasticidad mediante complejos mecanismos de regulación que involucran la activación de receptores glutamatérgicos, transportadores y *antiporters* de glutamato (Moussawi y col., 2011a). Específicamente, estudios reportaron concentraciones de glutamato basal extracelular de 1-30 μM monitoreadas mediante microdiálisis por el método de *no net flux* en diferentes regiones del cerebro de diferentes especies de mamíferos. La mayoría de estos estudios, y particularmente los realizados en NAc, encontraron niveles fisiológicos entre 1 y 5 μM (Baker y col., 2003; Melendez y col., 2005).

Fisiológicamente, el glutamato basal extracelular se ha reportado que tiene principalmente origen no sináptico, ya que el bloqueo de la liberación glial de glutamato procedente del *antiporter* Cis-Glu produjo una disminución significativa del 60% de los niveles de glutamato extrasináptico estriatal, mientras que la inhibición de la liberación vesicular presináptica de glutamato mediante el bloqueo de los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje produjo cambios menores (0-30%) (Baker y col., 2002), lo que indica que el origen primario del glutamato basal extrasináptico *in vivo* surge de la liberación de glutamato no vesicular por el *antiporter* Cis-Glu.

Presinápticamente, la liberación de glutamato glial puede activar los receptores mGluR2/3 situados en regiones perisinápticas en las neuronas glutamatérgicas aferentes a NAc (Moussawi y Kalivas, 2010). La estimulación de los autorreceptores de glutamato atenúa la liberación sináptica mediante la activación de los canales presinápticos de potasio, la inhibición de los canales presinápticos de calcio y la inhibición directa de la liberación vesicular

(Moussawi y Kalivas, 2010). A nivel postsináptico, el glutamato derivado de las células gliales también puede activar el receptor mGluR5 localizado en las MSNs GABAérgicas de NAc (Kalivas, 2009).

Similar a la liberación de glutamato de origen vesicular, la actividad del *antiporter* glial está regulada negativamente por la acción de los receptores mGluR2/3 (Baker y col., 2002; Xi y col., 2002). A su vez, como se observa en la figura 8, la recaptación de glutamato extracelular (de origen sináptico y no sináptico) mediante transportadores de glutamato, principalmente GLT-1 expresado en astrocitos, limita el acceso del glutamato liberado sinápticamente al espacio extracelular no sináptico y a los receptores mGluRs, y limita el acceso del glutamato liberado no sinápticamente (a través del intercambio Cis-Glu) a la hendidura sináptica y a los receptores iGluRs. En consecuencia, el glutamato derivado del intercambio Cis-Glu no estimula fácilmente los iGluRs sinápticos (Kalivas, 2009).

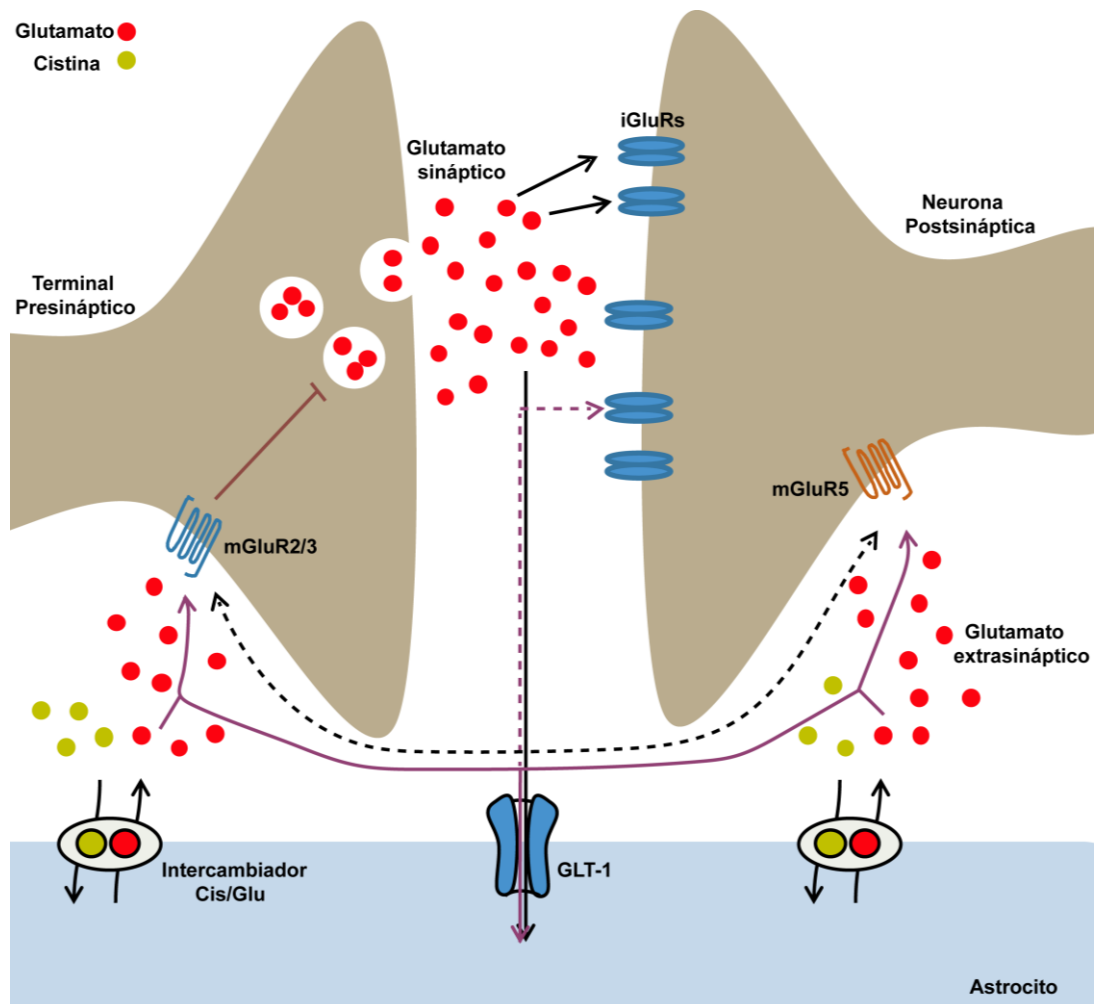


Figura 8. Versión simplificada de los mecanismos que regulan la homeostasis de glutamato. En la imagen se observa el terminal presináptico glutamatergico, la postsinapsis y la contribución astrogliar a este proceso homeostático. Imagen basada en la revisión de Kalivas, 2009.

Homeostasis de glutamato, estrés y adicción

Numerosos estudios en modelos animales han reportado que proteínas críticas encargadas del mantenimiento de la homeostasis de glutamato extracelular se hallaron alteradas tras la exposición a eventos estresantes o durante el período de abstinencia luego de la administración crónica de drogas.

Por un lado, se ha demostrado que la exposición crónica tanto a cocaína como a nicotina reduce la expresión de la subunidad catalítica xCT del intercambiador Cis/Glu que se expresa predominantemente en la membrana de las células gliales, principalmente astrocitos (Kalivas, 2009; Knackstedt y col., 2010; Trantham-Davidson y col., 2012). Sin embargo, la expresión del xCT no se observó disminuida tras la administración crónica de heroína (Shen y col., 2014) y tampoco alterada su función 21 días luego de la exposición a una sesión de estrés en un modelo experimental de estrés y vulnerabilidad a la adicción a cocaína (García-Keller y col., 2016).

La reducida expresión y función de xCT explica mecanísticamente los niveles basales disminuidos de glutamato extrasináptico observados después de la administración crónica de cocaína (Baker y col., 2003; Knackstedt y col., 2010; Trantham-Davidson y col., 2012). Este proceso sugiere la pérdida del tono de estimulación de los autorreceptores mGluR2/3 en NAc core con el consecuente incremento de la actividad excitatoria, particularmente en la proyección CPF-NAc core (Kalivas, 2009), lo que contribuiría a la potenciación de la señalización de glutamato durante la búsqueda de drogas disparada por estrés, claves o una inyección de la droga (McFarland y col., 2003, 2004; Scofield y Kalivas, 2014). Sumado a estas evidencias, experimentos complementarios posteriores sugirieron un efecto protector de la estimulación astrogliar empleando la novedosa técnica de DREADDs que permite el control farmacológico de la señalización intracelular, en este caso dirigida específicamente a astrocitos. Este evento fue relacionado con la señalización sináptica de los receptores metabotrópicos de glutamato mGluR2/3 (Scofield y col., 2015), sugiriendo que la alteración de la actividad astrogliar puede influir directamente en la conducta de búsqueda de droga.

Por otro lado, la expresión y función de GLT-1, transportador que trabaja de manera coordinada con el sistema Xc^- , se han reportado disminuidas en NAc core tras la exposición crónica a cocaína, nicotina, etanol y heroína (Das y col., 2015; Fischer-Smith y col., 2012; Gipson y col., 2013; Knackstedt y col., 2010; Reissner y col., 2015; Sari y Sreemantula, 2012; Shen y col., 2011, 2014). Esta alteración también fue observada tras la exposición a eventos estresantes en distintas regiones del circuito de recompensa (Almeida y col., 2010; Rappeneau y col., 2016; Zink y col., 2010) y particularmente en NAc core donde ha sido propuesto como un evento clave que subyace tanto a la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés como a la facilitación de la autoadministración de cocaína inducida por estrés (García-Keller y

col., 2016). En conjunto, estos resultados sugieren que la reducida expresión de GLT-1 es una respuesta maladaptativa, notablemente consistente tras la exposición a estrés y drogas adictivas de distintas características farmacológicas.

La disminución de la captación de glutamato retrasa la eliminación del neurotransmisor de la hendidura sináptica, favorece el derrame de glutamato (*spillover*) y amplifica la magnitud de la transmisión glutamatérgica. Además, la reducción de la expresión de GLT-1 permite que el glutamato liberado sinápticamente acceda a los compartimentos no sinápticos (Kalivas, 2009) y active potencialmente a los receptores postsinápticos localizados en la perisinapsis tales como los receptores mGluR5 y NMDA que contienen la subunidad NR2B (Kalivas y col., 2003). Estos eventos producen un aumento de la concentración de iones Ca^{2+} intracelular, la potenciación sináptica (Schotanus y Chergui, 2008; Yashiro y Philpot, 2008) y el disparo de la conducta de búsqueda de droga (Kalivas, 2009). En apoyo a estas evidencias, se ha demostrado que el antagonismo de los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B inhibe la reinstalación de la búsqueda de heroína (Shen y col., 2011), nicotina (Gipson y col., 2013) y etanol (Wang y col., 2010), lo que sugiere que estos receptores desempeñan un papel en la plasticidad sináptica inducida por la administración repetida de drogas de abuso.

Además de sus efectos sobre el glutamato extrasináptico y el desborde de glutamato producidos por la disminución funcional y en los niveles de expresión de xCT y GLT-1, respectivamente, la administración crónica de una gran variedad de drogas de abuso también puede inducir cambios directamente sobre la señalización glutamatérgica, a través de la alteración de los receptores mGluR2/3 favoreciendo la liberación de glutamato en NAc core. Evidencias de este evento neuroquímico se ha demostrado tras la retirada de nicotina, observándose una reducción de la expresión y la función de estos receptores en NAc (Moussawi y Kalivas, 2010). También se ha observado luego de la exposición crónica a etanol (Meinhardt y col., 2013) y a cocaína mediante la fosforilación y la desensibilización de los receptores mGluR2/3 (Xi y col., 2002) y el incremento de la expresión del activador de la señalización de la proteína G (AGS3) que bloquea la función de los receptores mGluR2/3 tanto en CPf como en NAc core (Kalivas, 2009; Kalivas y col., 2003).

El incremento en la liberación de glutamato sináptico disparado por la búsqueda de droga ha sido asociado a cambios plásticos en la morfología de las espinas dendríticas, en el tráfico de receptores y el contenido de ciertas proteínas a nivel postsináptico (Kalivas, 2009). Así por ejemplo, un incremento en la liberación de glutamato en NAc core durante la reinstalación de la búsqueda de nicotina, inducida por claves, ha sido relacionada a un potenciado incremento en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas de las MSNs en comparación con el incremento observado tras la abstinencia de la droga. Estos resultados se correlacionaron con un incremento de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA, NR2A y

NR2B de los receptores NMDA, cambios que consecuentemente denotaron un incremento en la relación de las corrientes AMPA/NMDA y un incremento en el tiempo de caída de las corrientes NMDA mediadas por la subunidad NR2B (Gipson y col., 2013). Datos similares fueron observados durante la reinstalación de la búsqueda de cocaína y heroína (Spencer y col., 2017; Shen y col., 2011, 2014).

Consistentemente, la liberación de glutamato inducida por una inyección de cocaína 21 días después de un tratamiento crónico no contingente con cocaína ha sido asociada a cambios duraderos en la morfología de espinas dendríticas, el contenido de proteínas y las propiedades electrofisiológicas en NAc core. Dichas alteraciones fueron observadas en animales expuestos a un esquema de administración repetida no contingente de cocaína que induce sensibilización a las propiedades estimulantes y reforzantes de la droga (Robinson y Kolb, 2004; Martin y col., 2006; Toda y col., 2006).

Particularmente, el aumento en el tamaño de las cabezas de las espinas dendríticas en NAc core ha sido correlacionado con el incremento en la expresión de receptores AMPA, la dinámica del citoesqueleto de actina y proteínas de la PSD en la membrana postsináptica observado a los 45 min de la administración de cocaína (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 glutamato se normalizaron, se observó la disminución del tamaño de las cabezas de las espinas acompañadas de modificaciones en el citoesqueleto de actina y una aparente reducción de la expresión de los receptores AMPA de superficie (Boudreau y col., 2007; Kourrich y col., 2007).

Hallazgos de nuestro laboratorio señalan que la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento modifica la plasticidad sináptica en NAc core mediante la influencia proactiva que ejerce el estrés sobre la capacidad de cocaína de inducir cambios en las proteínas de unión a actina (ABPs), el incremento en el tamaño de la PSD y el aumento de la expresión de la subunidad GluR1 de receptores AMPA tres semanas luego de la última sesión de estrés (Esparza y col., 2012). Estas rápidas adaptaciones observadas después de una inyección aguda de cocaína, en animales previamente estresados, son consistentes con las alteraciones en la homeostasis de glutamato en NAc core observadas 21 días luego de una sesión de estrés (García-Keller y col., 2013, 2016). Esta disrupción homeostática se correlacionó con un incremento en la densidad de espinas dendríticas, un incremento de la fuerza sináptica establecida mediante el aumento de la relación de las corrientes AMPA/NMDA, un incremento en el tiempo de caída de las corrientes NMDA mediada por la subunidad NR2B que denotó el derrame perisináptico de glutamato (García-Keller y col., 2016).

La exposición a estrés recapitula, en parte, la mayoría de los efectos de las drogas adictivas, particularmente cocaína, en NAc core (Esparza y col., 2012; García Keller y col.,

2013, 2016). Así, la desregulación de la homeostasis de glutamato en NAc core parece ser un evento compartido entre la exposición a eventos estresantes y la administración crónica de drogas adictivas.

Modulación neuroinmune de la homeostasis de glutamato: influencia del estrés y las drogas de abuso

La exposición repetida a drogas de abuso y estrés interactúan contribuyendo a la secuencia progresiva de etapas que conducen a la adicción (Volkow y col., 2016). En los últimos años, la señalización neuroinmune ha emergido como un potencial contribuyente al desarrollo de los trastornos por consumo de alcohol, opioides y psicoestimulantes (Crews y col., 2017; Lacagnina y col., 2016). Las drogas de abuso, al igual que el estrés, son potentes estímulos capaces de desencadenar respuestas neuroinflamatorias (Frank y col., 2011; Hutchinson y col., 2007; Weber y col., 2013).

La señalización neuroinflamatoria puede tener consecuencias beneficiosas capaces de restablecer la homeostasis tisular o maladaptativas en la función cerebral en caso de prolongarse en el tiempo iniciando cambios moleculares y conductuales (Crews y col., 2017; Frank y col., 2011; Lacagnina y col., 2016). Con respecto a estudios *in vivo* en modelos animales de estrés y adicción, recientemente se ha reportado que la sensibilización a cocaína inducida por estrés involucra mecanismos inmunológicos compartidos con humanos (Lo Iacono y col., 2018).

En la última década, novedosas publicaciones en el campo de la adicción han demostrado que morfina activa a la microglía a través de TLR2 y que este evento media los signos de abstinencia a la droga (Zhang y col., 2011). Además, se ha reportado que la activación microglial inducida por morfina subyace a la dependencia de la droga (Hutchinson y col., 2007) y media las propiedades reforzantes de los opiáceos (Hutchinson y col., 2008). Con respecto a cocaína, se ha descrito que su efecto reforzante estaría mediado, en parte, por la activación de la microglía a través de la unión directa de cocaína a TLR4 (Northcutt y col., 2015). Sumados a estos hallazgos, otros laboratorios indicaron que las células gliales se activan frente a la administración crónica de etanol (Crews y col., 2017) y metanfetamina (Liao y col., 2016). Frente a la activación por todas estas drogas de abuso, las células gliales son capaces de incrementar la expresión de las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) (Crews y col., 2017; Lacagnina y col., 2016).

Otros estudios han demostrado que los glucocorticoides y las catecolaminas liberadas tras la activación del eje HHA y el sistema nervioso simpático (SNS) en respuesta a estrés, respectivamente, alteran la microglía residente del cerebro (Wohleb y Godbout, 2013), induciendo profundos cambios morfológicos y funcionales (Mayhew y col., 2015; Walker y

col., 2013, 2014) y modulando el inmunofenotipo de estas células gliales (Frank y col., 2007, Nair y Bonneau, 2006; Tynan y col., 2010; Wohleb y col., 2011), lo que les otorga potencial para producir cambios neuroplásticos (Frank y col., 2011).

La activación microglial, inducida por la exposición a estrés y la potenciación de procesos neuroinflamatorios, ha sido bloqueada por un antagonista del receptor de glucocorticoides (Frank y col., 2012), sugiriendo que el estrés puede desplazar el microambiente neuroinmune hacia un inmunofenotipo proinflamatorio, similar a lo que ocurre con las drogas de abuso. Interesantemente, estudios han reportado que el estrés es capaz de sensibilizar a la microglía ya que la exposición a eventos estresantes o a glucocorticoides potencian las respuestas proinflamatorias frente a estímulos inflamatorios como la administración de drogas de abuso (Crews y col., 2017; Frank y col., 2012) o LPS *in vitro* sobre la microglía aislada de roedores expuestos previamente a estrés por *shock* eléctrico en las patas o estrés por derrota social (Frank y col., 2007; Wohleb y col., 2011).

Aunque existen diversas maneras de como la activación glial y la consiguiente liberación de mediadores inflamatorios podrían desempeñar un rol en el proceso adictivo, el hecho de que los mediadores inflamatorios, tal como TNF- α , sean capaces de reducir la expresión de GLT-1 (Tilleux y Hermans, 2007) aumentando así la actividad de la neurotransmisión glutamatérgica, es un dato sumamente relevante asociado a la homeostasis de glutamato y que no ha sido explorado aún en modelos animales de estrés y adicción a cocaína.

El glutamato en el SNC no sólo participa en procesos de plasticidad sináptica sino que ejerce un importante rol en la modulación neuroinmune, influyendo en la función neuronal y glial mediante su acción sobre sus receptores específicos.

Fisiológicamente, la motilidad de la microglía está regulada por la actividad neuronal y particularmente por glutamato (Dissing-Olesen y col., 2014; Fontainhas y col., 2011). El glutamato también puede inducir efectos neuroinflamatorios causados por mediadores secundarios, tales como las citoquinas y quemoquinas, y por la generación de radicales libres producidos por células gliales activadas (Hutchinson y col., 2007). Consistentemente, resultados de nuestro laboratorio reportaron que la sensibilización a nivel inmune inducida por anfetamina de manera paralela a lo que ocurre en el sistema límbico es mediada por un mecanismo dependiente de glutamato (Assis y col., 2009).

Debido a que fisiológicamente la glía participa activamente en la plasticidad sináptica, es plausible que la fisiología alterada de estas células pueda contribuir a alteraciones en la postsinapsis excitatoria y así a la fisiopatología de diversos trastornos neurológicos. La glía ejerce su influencia sobre alteraciones en la plasticidad inducida por drogas a través de factores inflamatorios que libera, alterando la transmisión excitatoria y su señalización (Hutchinson y col., 2007). Así, por ejemplo, el TNF- α es necesario para el aumento de los receptores AMPA

en superficie de membrana y la fuerza sináptica (Stellwagen y Malenka, 2006). Además, la elevada señalización proinflamatoria puede influir en la función neuronal al alterar funcionalmente a los astrocitos.

Una combinación de estudios *in vivo* e *in vitro* han reportado que en los astrocitos, la exposición al etanol induce la transcripción de NFκB, lo que aumenta la expresión de los genes inmunes innatos proinflamatorios (Pascual y col., 2007a; Zou y Crews, 2006, 2010) y reduce el transporte de glutamato de los astrocitos (Zou y Crews, 2005). El aumento de los niveles de glutamato extracelular provoca un aumento de la excitación neuronal y activación microglial (Zou y Crews, 2006). La participación de genes inmunes innatos en la reducción de los transportadores de glutamato y la consecuente hiperexcitabilidad reduce la función cortical frontal que contribuye de manera crítica a la neurobiología de la adicción (Crews y col., 2006; Crews y col., 2011).

En conjunto, estas evidencias denotan que tanto las drogas de abuso como el estrés tienen un importante impacto a nivel neuroinmune y en la homeostasis de glutamato en el SNC. Dado que la transmisión glutamatérgica se encuentra estrictamente regulada por los astrocitos y la microglía mediante complejos mecanismos de intercomunicación y que tanto las células microgliales como astrogiales son susceptibles de ser alteradas a nivel funcional por la exposición a estrés y drogas de abuso, es lógico pensar que cambios en las respuestas celulares y moleculares de estas células gliales tras la exposición a ambos estímulos contribuyan a la desregulación de la homeostasis de glutamato que subyace a respuestas conductuales alteradas asociadas a desórdenes de estrés y abuso de sustancias psicoactivas (Frank y col., 2011; Lacagnina y col., 2016; Mayhew y col., 2015) y, más aún, podrían ser la base de la vulnerabilidad a la adicción inducida por estrés.

Herramientas terapéuticas para restablecer la homeostasis de glutamato

Dado que la regulación de la transmisión glutamatérgica es dirigida por el glutamato extracelular, los mecanismos gliales de liberación y recaptación de glutamato son particularmente relevantes en la búsqueda de un tratamiento efectivo para la adicción (Kalivas, 2009). Evidencias contundentes en modelos animales han reportado que el desarrollo de conductas adictivas, puede ser inhibido mediante el restablecimiento de la homeostasis de glutamato en NAc core a través de la restauración de la expresión y función de GLT-1 y del sistema Xc^- , siendo ceftriaxona y NAC los fármacos más empleados para tal fin.

Ceftriaxona, es un antibiótico β-lactámico de la familia de las cefalosporinas de tercera generación, que se utiliza comúnmente en el tratamiento de la meningitis bacteriana. Además de su acción como antibiótico, se ha demostrado que ceftriaxona potencia la expresión y la función

de GLT-1 y del sistema Xc^- (Knackstedt y col., 2010; Trantham-Davidson y col., 2012). A través de este mecanismo favorece el incremento de la recaptación de glutamato y la normalización de los niveles de glutamato extrasináptico. De esta manera, ceftriaxona actúa contrarrestando el desborde de glutamato y la consecuente plasticidad sináptica en NAc core desencadenados tras la administración de drogas de abuso (Kalivas, 2009). Interesantemente, se ha demostrado que el mecanismo por el cual ceftriaxona incrementa la expresión de GLT-1 involucra la vía convencional de transcripción mediada por NF κ B (Lee y col., 2008).

Estudios conductuales en modelos animales han reportado que la administración repetida de ceftriaxona atenúa la sensibilización psicomotora inducida por anfetamina (Rasmussen y col., 2011) e inhibe la reinstalación de la conducta de búsqueda de cocaína inducida por claves o una inyección de la droga (Knackstedt y col., 2010). El tratamiento con ceftriaxona ha demostrado la capacidad de proporcionar una protección duradera contra la reinstalación de la conducta de búsqueda de cocaína cuando se administra semanas antes del ensayo de reinstalación conductual (Sondheimer y Knackstedt, 2011). Además, evidencias de nuestro laboratorio demostraron que un tratamiento sistémico crónico con ceftriaxona fue capaz de bloquear la expresión del fenómeno de sensibilización a cocaína y la facilitación de la conducta de autoadministración de esta droga en animales previamente expuestos a estrés (García-Keller y col., 2016). Si bien estos datos son prometedores, aun no se ha evaluado la eficacia de este fármaco en el tratamiento de la adicción en humanos.

NAC, es un antioxidante precursor del glutatión y se utiliza comúnmente en el tratamiento de la intoxicación por paracetamol (Murray y col., 2012). Se han reportado múltiples mecanismos de acción para este fármaco. Estudios demuestran que tiene efecto antioxidante, reduce la liberación de citoquinas y modula la liberación de dopamina así como el aumento de la liberación de glutamato glial mediante el sistema Xc^- (Murray y col., 2012). Debido a que NAC es una pro-droga de la cistina, actúa como sustrato del intercambiador Cis-Glu, restaura la función del sistema Xc^- y es capaz de restaurar la expresión de GLT-1 y de la subunidad catalítica xCT en animales con historia previa de exposición a drogas adictivas (Baker y col., 2003). Dado que favorece la liberación de glutamato glial, NAC ha sido propuesta como medio clave para la restauración del tono inhibitorio de los receptores mGluR2/3 presinápticos evitando potencialmente el desborde de glutamato e impidiendo la reinstalación a la búsqueda de la droga (Kalivas, 2009). En modelos animales se ha demostrado que la administración sistémica de NAC bloquea la reinstalación de la conducta de búsqueda de cocaína, heroína y nicotina, efecto que se revierte al antagonizar los receptores mGluR2/3 en NAc core (Moussawi y col., 2011b).

El restablecimiento de la expresión de GLT-1 en NAc core, mediante un tratamiento con NAC, fue necesario para la inhibición de la reinstalación de la conducta inducida tanto por

claves como por cocaína (Reissner y col., 2015). NAC ha demostrado una ventaja terapéutica adicional al ser eficaz no sólo cuando se administra durante la autoadministración o antes de la prueba de reinstalación conductual (Madayag y col., 2007; Murray y col., 2012; Reichel y col., 2011), sino que también facilita el aprendizaje de la extinción (Murray y col., 2012). La administración de NAC proporciona protección duradera contra la reinstalación de la búsqueda de cocaína (Reichel y col., 2011).

En ensayos clínicos en humanos, NAC ha sido probada con éxito en pacientes con dependencia a cocaína y nicotina, reportándose menores tasas de recaída al consumo de cocaína y menor cantidad de cigarrillos fumados (Murray y col., 2012). Un dato altamente importante es que estudios de resonancia magnética humana indican que NAC normaliza los niveles de glutamato extracelular en NAc de personas dependientes a cocaína sin que se observe ningún efecto en los individuos pertenecientes al grupo control (Schmaal y col., 2012).

Minociclina, una droga prometedora para el tratamiento de neuropatologías

Minociclina, es un antibiótico del grupo de las tetraciclinas de segunda generación que se emplea para el tratamiento del acné, infecciones urinarias, enfermedades de transmisión sexual y otras infecciones producidas por micoplasmas, clamídeas o treponemas (Jordán y col., 2006). Además de sus usos terapéuticos como antibiótico, se ha sugerido que podría utilizarse como fármaco neuroprotector en el tratamiento de ciertas patologías neurodegenerativas. Si bien su efecto antibiótico está dado por su unión a la subunidad ribosomal 30S bacteriana, impidiendo la interacción del ARN mensajero (ARNm) con el ARN de transferencia (ARNt) y por tanto la síntesis proteica, los mecanismos responsables de los efectos neuroprotectores de la minociclina no son totalmente claros. Este fármaco posee un importante efecto frente a la respuesta inflamatoria en el SNC ya que se ha reportado que tiene la capacidad de bloquear la activación de la microglía y posee propiedades anti-inflamatorias, mecanismos se cree serían los responsables de sus propiedades citoprotectoras en el SNC (Tikka y col., 2001).

La minociclina ejerce efectos protectores sobre la vasculatura y posee efecto inhibitorio sobre la expresión y actividad de las metaloproteasas (MMP), enzimas responsables de la remodelación de la matriz extracelular (MEC). Tiene efecto antioxidante, modula importantes vías de señalización intracelular y expresión de proteínas e inhibe las vías apoptóticas mediadas por las mitocondrias (Jordán y col., 2006).

En modelos animales de adicción se ha reportado que el tratamiento con minociclina ha sido empleado con éxito para atenuar la autoadministración de metanfetamina (Snider y col., 2013). En un modelo de preferencia condicionada a un sitio (CPP), la minociclina fue capaz de bloquear la preferencia al contexto asociado a cocaína en animales previamente expuestos a un

protocolo de estrés por derrota social (Lo Iacono y col., 2018). Además, en modelos animales de dolor neuropático, minociclina modificó los registros electrofisiológicos de neuronas en etapas tempranas y fases crónicas, revelando un rol específico de la microglía en la función neuronal (Hains y Waxman, 2006).

Minociclina ha sido probada en una gran variedad de modelos experimentales de neuropatologías que involucran la activación de la microglía en su patogenia (Garrido-Mesa y col., 2013). En cuanto a estudios clínicos, la eficacia de minociclina aún no ha sido evaluada en el tratamiento de la adicción en humanos. Recientemente se ha reportado que esta droga se encuentra inmersa en ensayos clínicos para depresión (Rosenblat y col., 2018), esclerosis múltiple (Metz y col., 2017) y accidente cerebrovascular hemorrágico e isquémico (Fouda y col., 2017), mientras que reportes previos señalaron el estudio de este fármaco en fase II y III para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, Corea de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (Bonelli y col., 2004; Traynor y col., 2006). Los datos publicados hasta la fecha provienen de estudios en los que fundamentalmente se ha evaluado su seguridad y toxicidad reportándose que minociclina, a dosis desde 100 mg hasta 400 mg diarios, resulta segura y no produce efectos secundarios graves. Estos reportes son altamente prometedores aunque no definitivos.

En conjunto, la extensa literatura hasta aquí reportada resalta la estrecha relación existente entre la transmisión glutamatérgica y la función glial. Más aún, estos hallazgos evidencian que las alteraciones de los mecanismos glutamatérgicos y gliales forman parte de un mecanismo común inducido tanto por las drogas de abuso como por las experiencias estresantes. Por lo tanto, el hecho de que la exposición a estrés y drogas adictivas puedan promover mecanismos neuroadaptativos compartidos, en el circuito de la motivación, refuerza la idea de que las alteraciones neurobiológicas, inducidas por el estrés en el cerebro, preparan el escenario para facilitar el desarrollo de conductas adictivas.

Si bien los estudios de nuestro y otros laboratorios en modelos animales de adicción a drogas e interacción estrés-droga, empleando fármacos que restauran la función glial y consecuentemente la homeostasis de glutamato, arrojaron datos prometedores, se desconoce el rol jugado por la microglía en los mecanismos glutamatérgicos en NAc core que median la vulnerabilidad a la adicción inducida por estrés crónico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Existen observaciones preclínicas claves que sustentan la hipótesis de esta tesis: 1) en modelos animales se han reportado mecanismos neurobiológicos comunes, inducidos por la exposición aguda y crónica a estrés y cocaína, en la aferencia prefrontal glutamatérgica hacia NAc core que subyacen la potenciación del efecto estimulante motor de cocaína (Esparza y col., 2012; García-Keller y col., 2013), la facilitación de la adquisición de la autoadministración de cocaína (García-Keller y col., 2016) y la conducta de búsqueda de la droga en animales sometidos a un protocolo de extinción conductual (Baker y col., 2003; McFarland y col., 2003; Moussawi y col., 2011b; Kalivas, 2009), 2) la manipulación farmacológica de los mecanismos gliales que regulan la transmisión glutamatérgica, alterados tras la administración crónica de cocaína, restablece la homeostasis de glutamato en NAc core y revierte los cambios conductuales (Knackstedt y col., 2010; Trantham-Davidson y col., 2012), 3) Minociclina, una droga que restaura la función de la microglía, ha sido probada con éxito en diferentes modelos animales de adicción a drogas (Snider y col., 2013; Lo Iacono y col., 2018; Zhang y col., 2006).

Sobre la base de estas contundentes evidencias, presumimos que la microglía, en estrecha relación con los astrocitos, ejerce un rol primordial en la influencia proactiva del estrés sobre la homeostasis glutamatérgica en NAc core, lo que subyace a la vulnerabilidad al desarrollo de sensibilización conductual a cocaína y la facilitación de la autoadministración de esta droga.

OBJETIVO GENERAL

A pesar de los valiosos progresos realizados y los prometedores avances llevados a cabo los últimos años hacia la comprensión de las bases biológicas de los trastornos de estrés y el uso de sustancias psicoactivas, los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la comorbilidad entre ambos desórdenes aún no han sido totalmente dilucidados. Más aún, el rol que cumple la microglía en la homeostasis de glutamato en NAc core y su influencia en la comorbilidad entre estos trastornos no han sido estudiados.

El objetivo principal de este estudio es evaluar el rol que desempeña la microglía en la influencia de la exposición a estrés crónico sobre los mecanismos glutamatérgicos (gliales, presinápticos y postsinápticos) en NAc core y su impacto en la sensibilización conductual a cocaína y la vulnerabilidad al desarrollo de adicción en un modelo de autoadministración mediante un tratamiento farmacológico sistémico con minociclina, un potente inhibidor de la activación de la microglía con propiedades anti-inflamatorias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo Específico 1. Determinar la influencia de la exposición a estrés crónico sobre el efecto estimulante motor de cocaína y la liberación de dopamina en NAc core y shell.

Evidencias de nuestro y otros laboratorios han demostrado que la exposición a una o varias sesiones de estrés inducen cambios a largo plazo en la transmisión dopaminérgica en NAc, core y shell, que conducen a la expresión del fenómeno de sensibilización cruzada a cocaína (Boyson y col., 2011, 2014; García-Keller y col., 2013, 2016) o anfetamina (Pacchioni y col., 2007). La expresión del fenómeno de sensibilización cruzada al efecto estimulante motor de anfetamina fue asociada a una potenciación de la liberación de dopamina en NAc core y shell 24 h luego de la exposición a una sesión de estrés por restricción de movimiento, fenómeno que persistió 7 días exclusivamente en NAc core (Pacchioni y col., 2007). Resultados similares fueron observados en NAc core, pero no en shell, en respuesta a cocaína 21 días después de una sesión de estrés (García-Keller y col., 2013).

Este objetivo propone validar el modelo de sensibilización conductual a cocaína inducido por estrés crónico evaluando el efecto estimulante de cocaína (15 mg/kg i.p.) sobre la actividad locomotora y la liberación de dopamina en NAc, core y shell, dos semanas después de la última sesión de estrés por restricción de movimiento.

Objetivo Específico 2. Determinar la influencia de la exposición a estrés crónico en la homeostasis de glutamato en NAc core y shell.

Diversos estudios han reportado que el glutamato extracelular se encuentra distribuido en compartimentos sináptico, perisináptico y extrasináptico a diferentes concentraciones, las cuales son reguladas mediante diferentes mecanismos (Moussawi y col., 2011a; Pendyam y col., 2009). Los principales reguladores de los niveles extracelulares de glutamato son el intercambiador Cis-Glu, que constituye la fuente primaria de glutamato extracelular que modula la liberación sináptica de glutamato por actuar sobre los receptores mGluR2/3 presinápticos (Baker y col., 2002) y el transportador de glutamato GLT-1 expresado principalmente en los astrocitos (Danbolt, 2001; Danbolt y col., 2016).

El GLT-1 es el principal transportador glutamatérgico del prosencéfalo, el cual remueve por recaptación aproximadamente el 90-94% del total de glutamato extracelular proveniente de fuente sináptica y extrasináptica (Tanaka y col., 1997; Danbolt, 2001). Estudios en modelos animales han demostrado que la discontinuación de la autoadministración de cocaína, nicotina y heroína induce una reducida expresión del transportador GLT-1 en NAc core (Knackstedt y col.,

2010, Gipson y col., 2013, Shen y col., 2014; Trantham-Davidson y col., 2012) y consecuentemente una alteración en la homeostasis glutamatérgica (Knackstedt y col., 2010, Gipson y col., 2013; Shen y col., 2011, 2014; Trantham-Davidson y col., 2012). En consistencia con estos hallazgos, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron resultados similares en NAc core 21 días luego de una sesión de estrés (García-Keller y col., 2013, 2016).

Aunque el rol desempeñado por la transmisión glutamatérgica a nivel de NAc en las alteraciones conductuales relacionadas con la adicción a drogas inducidas por estrés agudo o por la administración crónica de cocaína ha sido ampliamente estudiado, la participación del sistema glutamatérgico en el incremento a largo plazo del efecto estimulante motor de cocaína inducido por estrés crónico no ha sido caracterizada aún. Por ello, este objetivo propone evaluar la influencia de la exposición crónica a estrés sobre el efecto estimulante de cocaína (15 mg/kg i.p.) en la liberación de glutamato en NAc, core y shell, mediante la técnica de microdiálisis *in vivo*. Sobre la base de estos resultados, este objetivo propone evaluar la concentración basal de glutamato extracelular mediante el método de *no net flux* y la expresión del transportador de glutamato GLT-1 en fracción de membrana mediante *western blot* en NAc en animales previamente estresados.

Objetivo Específico 3. Evaluar la participación de la microglía en la expresión del fenómeno de sensibilización conductual a cocaína inducido por estrés crónico mediante un tratamiento sistémico con minociclina.

Un rol distintivo de la microglía, representado por alteraciones dinámicas en su estado de activación (Walker y col., 2014), ha sido atribuido al desarrollo de respuestas conductuales alteradas tras la exposición repetida a estrés y cocaína (Kreisel y col., 2013; Lewitus y col., 2016; Walker y col., 2013). Más aún, la alteración funcional del circuito de la motivación mediada por la activación de la microglía luego de la exposición a experiencias estresantes como el dolor crónico ha sido vinculada a conductas adictivas (Taylor y col., 2015).

Sobre la base de estas evidencias, este objetivo propone determinar si la microglía contribuye a la expresión de la sensibilización conductual cruzada a cocaína inducida por estrés crónico mediante un tratamiento sistémico con minociclina.

Objetivo Específico 4. Estudiar la influencia de la exposición a estrés crónico sobre la morfología y función de la microglía en NAc core.

Considerando que: 1) las células microgliales constituyen el sistema inmune innato del cerebro, son extremadamente plásticas (Kreutzberg, 1996) y sus cambios morfológicos han sido

correlacionados con distintos estados funcionales (Streit y col., 1988), 2) el glutamato extracelular, cuya concentración evaluada en NAc core en el objetivo 2 se encontró alterada 21 después de la exposición a estrés, es capaz de inducir neuroinflamación (Boldyrev y col., 2005), liberación de citoquinas proinflamatorias (Milligan y Watkins, 2009) y cambios significativos en la extensión y número de procesos microgliales (Eyo y col., 2014), 3) las alteraciones morfológicas, fenotípicas y funcionales de la microglía en áreas cerebrales que constituyen el circuito de la motivación han sido evidenciadas en respuesta no sólo a una gran variedad de protocolos de estrés, sino también a la administración repetida de drogas de abuso (Lewitus y col., 2016; Lacagnina y col., 2016; Walker y col., 2013) y que, 4) en respuesta a psicoestimulantes y estrés crónico se ha observado un perfil de expresión de citoquinas proinflamatorias alterado (Yamada y Nabeshima, 2004; Grippo y col., 2005; Frank y col., 2012); en nuestro modelo experimental resulta clave determinar la influencia de la exposición a estrés crónico sobre la morfología y función de la microglía en NAc core dos semanas luego de la última sesión de estrés.

Este objetivo propone: 1) evaluar la morfología de la microglía, el número de células que expresan Iba-1 (marcador de microglía) y la inmunoreactividad de Iba-1 mediante la técnica de inmunofluorescencia, 2) cuantificar los niveles de expresión de ARNm que codifican para citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) mediante PCR *real time* y, 3) determinar la influencia de un tratamiento sistémico con minociclina sobre todos estos parámetros a evaluar con el fin de corroborar el efecto inhibitor de la activación de la microglía y las propiedades anti-inflamatorias de esta tetraciclina.

Objetivo Específico 5. Determinar la contribución de la microglía en la influencia de la exposición a estrés crónico sobre la expresión de GLT-1, la inmunoreactividad de GFAP y la concentración basal de glutamato extracelular en NAc core mediante su modulación con un tratamiento sistémico con minociclina.

La transmisión glutamatérgica está finamente regulada por las células gliales. Estudios en modelos animales de epilepsia o dolor crónico han reportado que periodos de intensa actividad neuronal glutamatérgica alteran críticamente el estado fisiológico de la microglía (Eyo y col., 2014), y posteriormente, el estado funcional de los astrocitos (Milligan y Watkins, 2009). Una importante liberación de glutamato en NAc core ocurre frente a situaciones de estrés (Moghaddam, 1993) o búsqueda de drogas adictivas (Madayag y col., 2007; LaLumiere y col., 2008). Ambos estímulos son capaces de inducir importantes perturbaciones de la función glial promoviendo, a su vez, la alteración de los mecanismos glutamatérgicos (Mayhew y col., 2015; Kalivas, 2009).

El glutamato, además de su rol en la plasticidad sináptica en el SNC, induce eventos neuroinflamatorios ya que causa liberación de citoquinas por su acción sobre células gliales (Hutchinson y col., 2007). Estos mediadores inflamatorios, producidos tras la activación del sistema inmune innato en el cerebro, han sido asociados directamente a la modulación de mecanismos glutamatérgicos tal como la regulación de los niveles de expresión de transportadores glutamatérgicos (Tilleux y Hermans, 2007).

Este objetivo propone investigar si la microglía contribuye a la desregulación de la homeostasis de glutamato inducida por estrés (evaluada durante el desarrollo del objetivo 2) mediante la evaluación del efecto de un tratamiento sistémico con minociclina en la influencia de la exposición a estrés crónico sobre: 1) la expresión de GLT-1 mediante la técnica de *western blot*, 2) la inmunoreactividad de GFAP (marcador de astrocitos) determinada por inmunofluorescencia y, 3) la concentración basal de glutamato extracelular en NAc core mediante el método de *no net flux*.

Objetivo Específico 6. Estudiar el rol de la microglía en la influencia de la exposición a estrés crónico sobre la morfología de espinas dendríticas en NAc core mediante su modulación con un tratamiento sistémico con minociclina.

Las espinas dendríticas son el sitio postsináptico de la mayoría de las sinapsis excitatorias del SNC (Harris y Kater, 1994), así como el blanco de los cambios plásticos dependientes de experiencias (Kasai y col., 2003).

Las alteraciones persistentes en los mecanismos glutamatérgicos observados luego de la exposición a estrés y la autoadministración de drogas de abuso han sido asociadas a duraderas adaptaciones postsinápticas, estructurales y funcionales, en las MSNs (García-Keller y col., 2016; Kalivas, 2009; Knackstedt y col., 2010; Scheyer y col., 2014; Trantham-Davidson y col., 2012).

Sumado al efecto de glutamato a nivel postsináptico, mecanismos microgliales discretos, inducidos por experiencias estresantes y la administración de drogas adictivas, han sido asociados directamente a cambios plásticos postsinápticos (Wohleb y col., 2018; Lewitus y col., 2016; Clark y col., 2015).

Considerando estos antecedentes, los resultados obtenidos en el objetivo 5, los cambios a nivel postsináptico observados previamente en nuestro laboratorio (Esparza y col., 2012; García-Keller y col., 2016) y la influencia de minociclina sobre la actividad neuronal en modelos experimentales de dolor crónico (Hains y Waxman, 2006); este objetivo propone estudiar la influencia de un tratamiento sistémico con minociclina sobre la densidad y la morfología de las espinas dendríticas de NAc core en animales previamente estresados.

Objetivo Específico 7. Evaluar el efecto de un tratamiento sistémico con minociclina en la influencia facilitadora del estrés crónico sobre la autoadministración de cocaína.

El desarrollo del fenómeno de sensibilización conductual es altamente predictivo de la conducta de autoadministración de drogas, ya que facilita la adquisición de dicha conducta y constituye un factor clave en los primeros encuentros con la droga (Robinson y Berridge, 2001).

La influencia del estrés en la autoadministración de drogas ha sido documentada por estudios previos de nuestro y otros laboratorios (Piazza y Le Moal, 1998; Boyson y col., 2011, 2014; García-Keller y col., 2016).

Estudios enfocados en los efectos del estrés a nivel neuroinmune han reportado que la sensibilización neuroinflamatoria inducida por diferentes tipos de estímulos estresantes constituye un factor predisponente para el desarrollo de trastornos psiquiátricos en los que la neuroinflamación forma parte de su patogenia (Frank y col., 2007, 2011, 2016; Johnson y col., 2004; Weber y col., 2013; Wohleb y col., 2011, 2012). De manera consistente, el efecto de minociclina ha sido probado con éxito en un estudio dosis-respuesta en un modelo de autoadministración de metanfetamina (Snider y col., 2013). Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que reporten la participación de la microglía en la potenciación de la conducta de autoadministración de cocaína inducida por estrés. Por ello, este objetivo propone estudiar el efecto de un tratamiento sistémico con minociclina sobre la influencia facilitadora del estrés crónico en la adquisición de la conducta de autoadministración y la especificidad de la participación de la microglía mediante la evaluación de la adquisición de la conducta de autoadministración de un reforzador natural como la sacarosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES

1.1. Animales

Los experimentos fueron realizados utilizando ratas macho adultas de la cepa Wistar provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina y ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley provenientes de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Al momento de inicio del protocolo experimental, tenían aproximadamente 2 meses de edad (± 1 semana) y se encontraban en un peso aproximado de 280-330 g. Fueron alojadas de a cuatro en sus cajas hogar (12 cm x 30 cm x 50 cm), fueron mantenidas a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (comenzando el ciclo de luz a las 7:00 h y finalizando a las 19:00 h) y dispusieron de libre acceso a alimento y agua. Es importante destacar que antes de iniciar los procedimientos experimentales, los animales de ambas cepas fueron habituados durante una semana a la habitación de tratamiento donde fueron alojados durante el procedimiento experimental.

Los animales de la cepa Sprague Dawley fueron seleccionados únicamente para llevar a cabo los experimentos de autoadministración. Estos experimentos se realizaron durante el ciclo de oscuridad, el cual fue invertido durante el proceso experimental (iniciando el ciclo de oscuridad a las 7:00 h y finalizando a las 19:00 h). Luego de la cirugía a la cual fueron sometidos, estos animales fueron alojados de a dos en sus cajas hogar para garantizar un mejor cuidado de los mismos. Para más detalles ver la descripción del modelo experimental.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de cuidado y uso de animales (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (Resolución Decanato FCQ-UNC 1393/2018) de acuerdo con la reglamentación para el cuidado y uso de animales de laboratorio del *National Institute of Health* (NIH, USA).

1.2. Drogas

Se utilizó clorhidrato de cocaína (Laboratorios Verardo, Buenos Aires, Argentina) disuelto en solución salina isotónica estéril (NaCl 0,9% p/v) y clorhidrato de minociclina (generosamente donado por Laboratorios RAYMOS, Buenos Aires, Argentina) disuelto en solución de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) al 5% v/v y llevado a pH = 7,4 con NaOH 0,1 M.

1.3. Estrés crónico por restricción de movimiento

Los animales fueron asignados al azar a los siguientes grupos experimentales: Estrés y No-Estrés. Los animales pertenecientes al grupo Estrés fueron expuestos a estrés crónico por restricción de movimiento (2 h/día) durante siete días consecutivos, dentro del horario de las 10:00 a 14:00 h durante el ciclo de luz (Capriles y Cancela, 1999). El dispositivo para inducir estrés consta de un cilindro acrílico de Pexiglas que contiene ranuras para permitir la respiración normal del animal y una compuerta de acrílico con una pequeña abertura, la cual permite que la cola del animal permanezca fuera del dispositivo. Los animales pertenecientes al grupo No-Estrés fueron mantenidos en sus respectivas cajas hogar con la única manipulación que se requiere para el cuidado de los mismos (pesaje y limpieza de las cajas dos veces por semana). Luego de cada sesión de estrés, los animales mostraron aspecto saludable, lo cual fue evidenciado al evaluar la textura del pelo y peso corporal (Cancela y col., 1996). Tampoco se detectaron diferencias en relación al pelaje y peso entre las ratas no estresadas y las previamente estresadas al momento de ser sacrificadas para tomar muestras para estudios bioquímicos o realizarse los experimentos conductuales y neuroquímicos.

1.4. Tratamiento con minociclina

El clorhidrato de minociclina fue seleccionado por su capacidad para inhibir la activación de microglía *in vivo* (Tikka y col., 2001) y por sus propiedades anti-inflamatorias (Kobayashi y col., 2013). Los animales fueron asignados aleatoriamente a la inyección intraperitoneal (i.p.) de solución vehículo (Veh; DMSO 5% v/v/12 h i.p.) o solución de clorhidrato de minociclina (Mino; 30 mg/Kg/12 h i.p.), constituyéndose así los siguientes grupos experimentales: No-Estrés/Vehículo (No-Estrés/Veh), Estrés/Vehículo (Estrés/Veh), No-Estrés/Minociclina (No-Estrés/Mino) y Estrés/Minociclina (Estrés/Mino).

1.5. Modelo experimental de sensibilización cruzada a cocaína inducido por estrés

Luego de una semana de aclimatación a la habitación de tratamiento, el paradigma de sensibilización cruzada estrés-cocaína consistió en una fase de inducción de la sensibilización, donde los animales asignados al azar al grupo Estrés fueron sometidos a estrés crónico por restricción de movimiento (2 h/día) durante siete días consecutivos (días 1-7), mientras que los animales No-Estrés fueron mantenidos en sus respectivas cajas hogar. Desde el día 8 al día 20, todos los animales permanecieron en sus respectivas cajas hogar con la única manipulación que se requiere para el cuidado de los mismos.

Los animales fueron asignados al azar a los diferentes experimentos. El día 21 (dos semanas luego de la última sesión de estrés) se llevaron a cabo los experimentos conductuales, neuroquímicos y bioquímicos, y los animales recibieron una inyección i.p. de solución salina (Sal) y/o cocaína (Coc; 15 mg/Kg) dependiendo del experimento al que fueron asignados. La figura 9 corresponde a un esquema general del protocolo experimental utilizado en los experimentos incluidos en los objetivos 1 y 2.

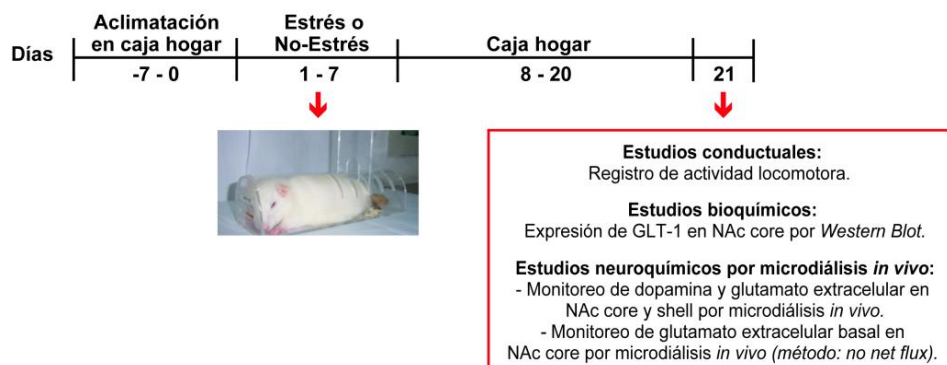


Figura 9. Protocolo experimental empleado para evaluar la expresión de sensibilización conductual a cocaína inducida por la exposición crónica a estrés y estudiar los mecanismos neuroquímicos y bioquímicos asociados al fenómeno.

Con el objetivo de evaluar la participación de microglía en los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la sensibilización conductual cruzada a cocaína inducida por estrés crónico, se llevó a cabo el mismo protocolo experimental previamente descrito con la única diferencia que a partir del día 16 después de la primera sesión de estrés, los animales del grupo Estrés y No-Estrés recibieron un tratamiento i.p. con clorhidrato de minociclina (30 mg/Kg) o vehículo cada 12 h (diez dosis consecutivas) hasta el día 21. El día 21 recibieron la última dosis de tratamiento (Mino o Veh) al menos 4 h antes del registro de actividad locomotora en respuesta a una inyección aguda de solución salina (Sal; i.p.) y cocaína (Coc; 15 mg/Kg i.p.).

Por otro lado, con el fin de determinar la influencia del tratamiento sistémico con minociclina en el efecto a largo plazo de la exposición a estrés crónico sobre la homeostasis de glutamato y la función de células gliales (microglía y astrocitos), el día 21 (dos semanas después del último episodio de estrés) se llevaron a cabo experimentos neuroquímicos, bioquímicos y microscópicos. Al igual que en el experimento conductual, la última dosis de tratamiento (Mino o Veh) se administró aproximadamente 4 h antes de la toma de muestras. La figura 10 corresponde a un esquema general del protocolo experimental utilizado en los experimentos incluidos en los objetivos 3, 4, 5 y 6.

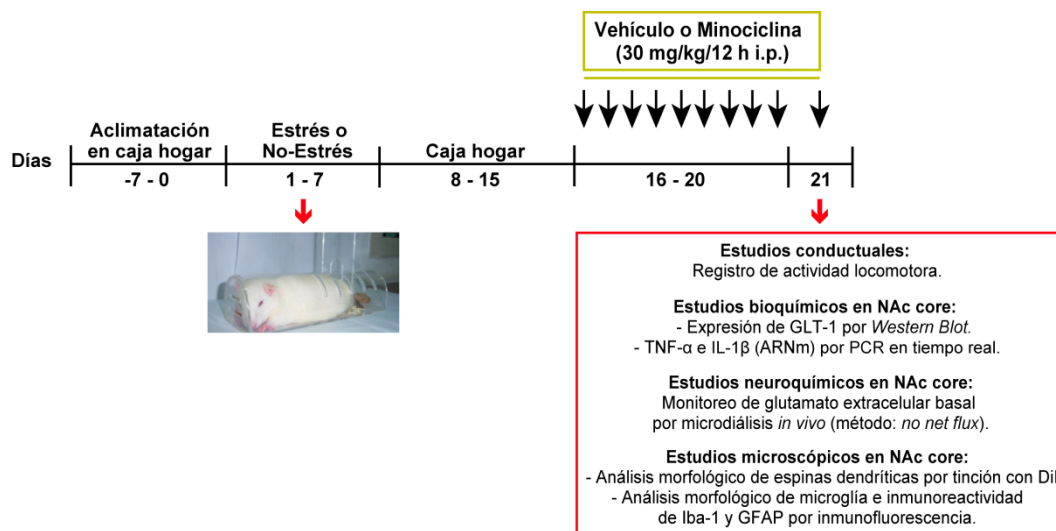


Figura 10. Protocolo experimental empleado para evaluar la influencia del tratamiento con minociclina en la expresión de sensibilización conductual a cocaína inducida por la exposición crónica a estrés y en los mecanismos neuroquímicos, moleculares y celulares asociados a la exposición a estrés.

1.6. Modelo experimental de autoadministración de cocaína inducido por estrés

Luego de una semana de aclimatación a la habitación de tratamiento, los animales asignados al azar al grupo Estrés fueron sometidos a estrés crónico por restricción de movimiento (2 h/día) durante siete días consecutivos (días 1-7), mientras que los animales No-Estrés fueron mantenidos en sus respectivas cajas hogar.

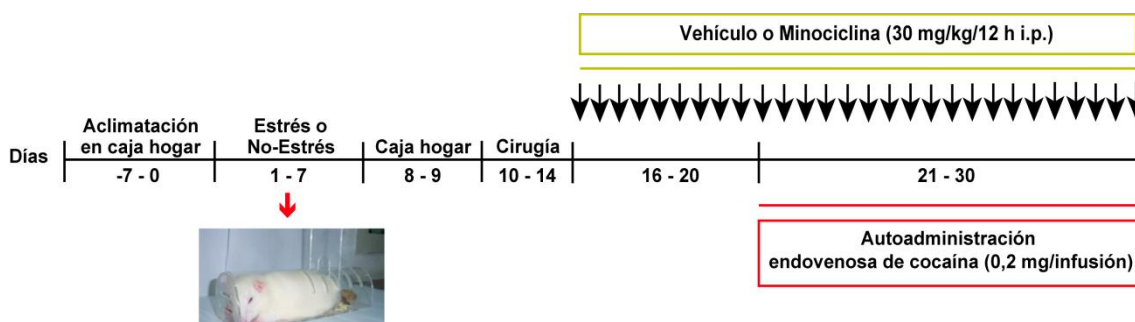


Figura 11. Protocolo experimental empleado para evaluar la influencia del tratamiento con minociclina en la facilitación de la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína en animales previamente expuestos a estrés.

Desde el día 10 al día 14 después de la primera sesión de estrés, los animales fueron expuestos a una cirugía para la implantación permanente de un catéter en la vena yugular. A partir del día 16 después de la primera sesión de estrés, los animales del grupo Estrés y No-

Estrés recibieron un tratamiento con clorhidrato de minociclina (Mino; 30 mg/Kg, i.p.) o vehículo (Veh; DMSO 5%, i.p.) cada 12 h, el cual se extendió hasta finalizar el experimento conductual (días 16-30). Luego de la recuperación de la cirugía y a partir del día 21, los animales fueron expuestos a un paradigma diario (2 h/día) de autoadministración endovenosa de cocaína (0,2 mg/infusión) en cajas de conducta operante (Med Associates Inc., St Albans, VT, USA) bajo un esquema de razón fija 1 (FR1) durante 10 días (días 21-30) basado en el protocolo de García-Keller y col. (2016). La figura 11 corresponde al protocolo de autoadministración de cocaína incluido en el objetivo 7.

2. ESTUDIOS CONDUCTUALES

2.1. Registro de actividad locomotora

La actividad locomotora fue monitoreada utilizando un equipo llamado actógrafo, el cual consta 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 de cada caja y acopladas a una computadora cuyo software traduce la interrupción de cualquiera de los haces de luz a una cuenta de fotocélula (LIADE, FCEFYN-UNC, Córdoba, Argentina).

El día 21 del esquema experimental, los animales se colocaron individualmente en cada caja, el test conductual consistió en registros de actividad locomotora horizontal durante 240 minutos (min) y las interrupciones de los haces se registraron en intervalos de 10 min. Al iniciar el experimento conductual, los animales fueron expuestos a un período de habituación de 60 min. Luego, recibieron una inyección i.p. de solución salina y se registró la actividad motora durante 60 min. Los mismos animales recibieron posteriormente una dosis desafío de cocaína (15 mg/kg, i.p.) y el monitoreo en respuesta a la droga se realizó durante 120 min. Los datos fueron expresados como el promedio de las cuentas cada 10 min a lo largo del *test* para cada grupo experimental o el promedio de las cuentas totales luego de la inyección de salina o cocaína para cada grupo experimental. La elección de la dosis de cocaína se realizó en base a resultados previos del laboratorio obtenidos en experimentos conductuales a partir de un estudio dosis-respuesta (García-Keller y col., 2013).

2.2. Autoadministración

2.2.1. Construcción del catéter

Los catéteres intravenosos (figura 12) fueron contruidos en el laboratorio a partir de una cánula tipo conector (número de catálogo PHM-131, Med Associates Inc.) formada por un

tubing metálico de extremos romos de calibre 22 G en forma de “L” incrustado sobre un pedestal plástico en cuya base se adhirió una malla quirúrgica monofilamento de polipropileno (Atrium, NH, USA; número de catálogo 1000606-00) fijada con cemento dental. Este pedestal conector permite la conexión con el brazo pendular de administración de drogas durante cada sesión de autoadministración. El extremo del *tubing* metálico que asoma por el lateral del pedestal fue conectado a un *tubing* de silicona de grado médico de 12,5 cm de longitud (*Platinum cured silicone tubing*, ETC International S.A., Argentina; número de catálogo 72-1042; 0,3 mm diámetro interior x 0,6 mm diámetro exterior). A 2,5 cm de largo del otro extremo del *tubing* de silicona, se sujetó un collar de silicona que sirve de tope para anclar el catéter a la vena yugular al momento de su implantación. Se añadió un *tubing* protector de silicona de grado médico (*Platinum cured silicone tubing*, ETC International S.A., Argentina; número de catálogo 72-1044; 0,6 mm de diámetro interior x 1,2 mm de diámetro exterior) de 2,5 cm de longitud a modo de funda para proteger la conexión de alta presión entre el *tubing* metálico de la cánula tipo conector y el *tubing* de silicona que se introduce en la vena. Antes de su implantación, los catéteres fueron esterilizados.

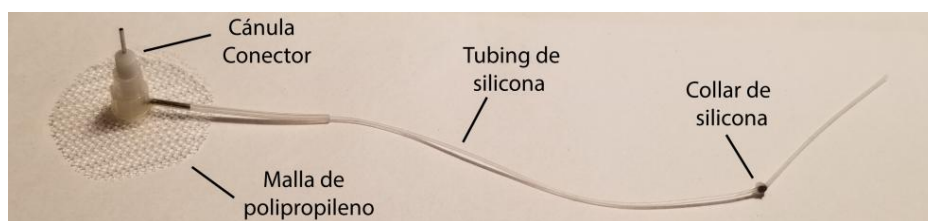


Figura 12. Catéter endovenoso construido en el laboratorio a partir de una cánula tipo conector asociada a una malla de polipropileno en su base y conectada a un *tubing* de silicona.

2.2.2. Procedimientos de autoadministración: cirugía y mantenimiento postoperatorio

Desde el día 10 al 14 después de la primera sesión de estrés, los animales asignados al experimento de autoadministración de cocaína fueron sometidos a una cirugía de implantación de un catéter, de manera permanente, en la vena yugular (García-Keller y col., 2016). Para ello, todos los animales fueron anestesiados con ketamina (55 mg/kg i.p.; Holliday, Argentina) y xilazina (11 mg/kg i.p.; Kensol-König, Argentina). Durante el procedimiento quirúrgico se realizaron tres incisiones, dos en la parte superior del lomo del animal y otra en el cuello. El catéter fue introducido subcutáneamente en la parte superior del lomo a 2 cm de la zona interescapular de la rata y dirigido hacia la región ventral del cuello del animal. Allí, fue introducido en la vena yugular hasta el tope presente en el *tubing* de silicona que conforma el catéter y fue sujetado a la vena con hilos para sutura quirúrgica. Las incisiones fueron suturadas

y se administró polvo cicatrizante (Laboratorios Andrómaco, Argentina). Para cerrar el circuito y evitar posibles infecciones, el extremo externo del *tubing* metálico del pedestal conector se protegió con un tapón de silicona y un dispositivo metálico. Esta protección fue mantenida durante todo el protocolo experimental y sólo fue retirada al momento de realizar algún tratamiento y durante el *test* de autoadministración. Luego de la cirugía y antes de iniciar el esquema conductual, los animales se recuperaron durante una semana. Desde el día de la cirugía, los animales fueron administrados diariamente por vía endovenosa con 0,2 ml de solución de clindamicina (15 mg/ml; Pfizer, Argentina), siguiendo un protocolo de 5 días para prevenir infecciones y 0,1 ml de solución de heparina sódica (200 UI/ml) hasta terminar el experimento para evitar la formación de coágulos y mantener la fluidez en el catéter.

2.2.3. Equipo de autoadministración

Las sesiones de autoadministración se llevaron a cabo en cajas de conducta operante (Med Associates Inc.) colocadas dentro de cubículos de atenuación de sonido con extractores que enmascaran ruidos externos (figura 13).

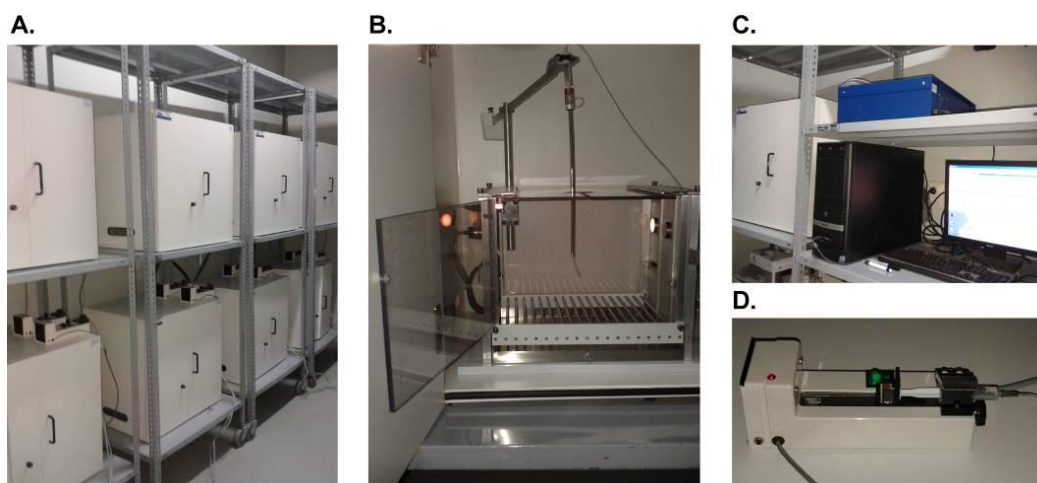


Figura 13. A) Cubículos de atenuación de sonido que contienen en su interior las cajas de conducta operante. B) Cajas de conducta operante. C) Interfase (equipo color azul), sitio de conexión de todas las cajas de conducta operante, asociada a una computadora con software Med-PC. D) Bomba de infusión.

Cada caja está equipada con una luz de caja permanentemente encendida durante cada sesión de autoadministración, un piso de rejilla de acero inoxidable, una palanca activa acoplada a una señal lumínica (situada encima de la palanca) y un tono discreto, una palanca inactiva y un brazo pendular de entrega de drogas. Este brazo se encuentra asociado a un arnés metálico en cuyo interior se encuentra un *tubing* de polietileno conectado a una bomba. La bomba impulsa

una jeringa para la entrega de cocaína. El otro extremo del *tubing* de polietileno fue conectado al pedestal conector implantado en el animal en cada sesión conductual. En caso de autoadministración de sacarosa, cada caja fue acoplada a un dispositivo *liquid dipper*. Este dispositivo consta de un brazo mecánico en cuyo extremo contiene un pequeño recipiente (pocillo) metálico que entrega la solución de sacarosa. Las entradas y salidas eléctricas de cada caja se controlaron con el software Med-PC (Med Associates Inc.).

2.2.4. Registro de la conducta de autoadministración de cocaína

El protocolo de autoadministración de cocaína se realizó de acuerdo a García-Keller y col. (2016) con modificaciones menores. Los animales no fueron expuestos a una fase de entrenamiento previa. El día 21 después de la primera sesión de estrés, los animales fueron colocados en las cajas de conducta operante (Med Associates Inc.) y conectados al pedestal conector implantado en el lomo del animal mediante un arnés metálico en cuyo interior se encuentra un *tubing* de polietileno por el cual se infundió la droga hacia el catéter intravenoso, tal como se observa en la figura 14.

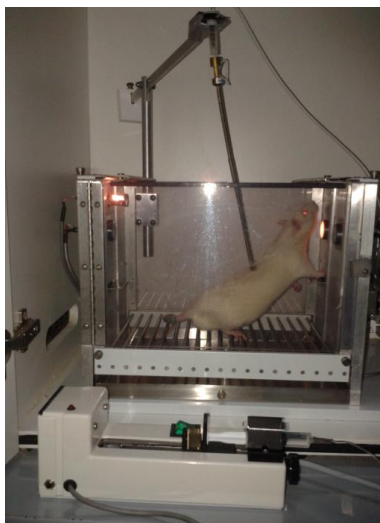


Figura 14. Imagen ilustrativa de una rata de la cepa Sprague Dawley expuesta a un paradigma de autoadministración endovenosa. Fotografía tomada durante el desarrollo de los experimentos de la presente tesis en el Bioterio del Dpto. de Farmacología, FCQ-UNC, IFEC-CONICET. En la figura se observa la conexión del arnés metálico al pedestal conector del catéter implantado subcutáneamente en el animal. El arnés metálico, en su interior, es recorrido por un *tubing* de polipropileno directamente conectado a la jeringa que contiene una solución de clorhidrato de cocaína, la cual es impulsada por la bomba de infusión al presionar la palanca activa.

En cada sesión del *test* conductual, las ratas se autoadministraron cocaína durante 2 h en un esquema de razón fija 1 (FR1), en el que la presión de la palanca activa fue reforzada con

una infusión intravenosa de cocaína (0,2 mg/infusión; 0,05 ml de infusión de cocaína durante 4 s). La entrega de la droga fue apareada a dos claves, una señal de luz y un tono discreto, que reforzaron la conducta. Cada infusión de cocaína fue seguida de un período de espera (*time out*) de 10 s para prevenir la sobredosis. Durante este período de espera se registraron las presiones de la palanca activa, pero no se entregó reforzador. También se registraron las presiones de la palanca inactiva a lo largo de cada sesión.

El protocolo de autoadministración se llevó a cabo durante 10 días consecutivos. La dosis de cocaína empleada fue elegida en base al protocolo de García-Keller y col. (2016). El criterio de adquisición de la conducta de autoadministración se definió como la administración de 10 o más infusiones por sesión durante dos días consecutivos. Los animales que en los primeros días de autoadministración pulsaron aleatoriamente ambas palancas registrando un número de presiones de la palanca inactiva superior a 30, los que no cumplieron el criterio de adquisición de la conducta establecido, los que bajaron de peso abruptamente luego de la cirugía, o aquellos que no tuvieron fluidez en sus catéteres en algún momento del experimento fueron excluidos del análisis estadístico.

2.2.5. Inferencia de la concentración de cocaína en cerebro durante la autoadministración de cocaína

Para investigar e inferir la concentración de cocaína en cerebro durante cada sesión de autoadministración, las infusiones de cocaína se convirtieron en concentraciones cerebrales de la droga utilizando el software Matlab (MathWorks) y la siguiente ecuación obtenida de un estudio farmacocinético (Pan y col., 1991):

$$c = dk(e^{-\beta t} - e^{-\alpha t}) / v(\alpha - \beta)$$

Donde d es la dosis de cocaína por infusión (0,2 mg; 0,659 μmol), κ la constante de la tasa de transferencia entre la sangre y el cerebro (0,223 min^{-1}) y v el volumen aparente de distribución en el cerebro (0,044 l). Las constantes α (0,642) y β (0,097) representan la tasa de distribución sangre-cerebro y la tasa de eliminación del cuerpo, respectivamente. Este análisis se realizó exclusivamente en el animal más representativo de cada grupo experimental.

2.2.6. Registro de la conducta de autoadministración de sacarosa

Para evaluar la especificidad del tratamiento con minociclina sobre la influencia de estrés crónico en la autoadministración de cocaína, evaluamos la ingesta de sacarosa siguiendo el mismo protocolo experimental descrito en la figura 11 y los mismos criterios empleados

para la autoadministración de cocaína, con la única diferencia que este grupo de animales no fue sometido a cirugía por tratarse de un protocolo de autoadministración oral de sacarosa.

Los animales designados para el experimento de autoadministración de sacarosa al igual que los animales involucrados en el experimento de autoadministración de cocaína, tampoco fueron expuestos a una fase previa de entrenamiento. La solución de sacarosa se administró por vía oral a través de un dispositivo *liquid dipper* (Med Associates Inc.). La presión de palanca activa fue reforzada con la entrega de solución de sacarosa (Biopack, Argentina) al 10% p/v en un recipiente de bebida (0,2 ml durante 10 s) siguiendo el esquema FR1 previamente descrito.

3. ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS

3.1. Fundamento de la técnica de microdiálisis *in vivo*

La técnica de microdiálisis permite monitorear la liberación de neurotransmisores o sus metabolitos en animales vivos y despiertos. El método consiste en la implantación de una sonda de diálisis (*probe*) en el área cerebral a estudiar. La sonda de microdiálisis está formada por dos porciones de sílica muy finas recubiertas por agujas metálicas a través de las cuales ingresa y egresa, a flujo constante, una solución similar al líquido cefalorraquídeo (LCR artificial o solución Ringer). En su extremo inferior la sonda posee una membrana de diálisis que permite la difusión pasiva de sustancias a favor de su gradiente de concentración entre el líquido extracelular presente en el área donde se colocó la sonda y el líquido cefalorraquídeo artificial que circula en el interior de la misma. Los dializados se colectan y posteriormente se analizan para determinar los niveles de neurotransmisores.

3.2. Construcción de las sondas (*probes*) para microdiálisis

Las sondas de microdiálisis (figura 15) fueron construidas en el laboratorio de acuerdo con nuestros datos previamente publicados (Pacchioni y col., 2002; García-Keller y col., 2013) y según el método de Di Chiara y col. (1993b), con pequeñas modificaciones.

Cada sonda de diálisis vertical constaba de cánulas de acero inoxidable de calibre 22 G (BD, Argentina) y capilares de sílice fundida (diámetro interior 50 μm , diámetro exterior 150 μm ; Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) colocados internamente a través de la sonda. Cada sonda consistía en un puerto de entrada y uno de salida, y una membrana semipermeable en el extremo inferior de la sonda sellada en su extremo final para cerrar el circuito.

La membrana de diálisis (AN69HF, Hospal-Gambro, Meyzieu, Francia), generosamente donada por la empresa UniFarma-Argentina, constaba de un área activa de diálisis de 2,0 mm de

longitud para el NAc (core y shell) y estaba constituida por un copolímero de poliacrilonitrilo/metilulfonato de sodio con un *cutoff* de peso molecular de 10 kDa (diámetro interior 240 μm , diámetro exterior 310 μm , grosor de la pared 50 μm , con un tamaño medio de los poros de 29 Å). Todo el ensamblaje de la sonda fue fijado con adhesivo epoxi.

Para probar la eficacia de recuperación y el funcionamiento de nuestras sondas de microdiálisis, se realizó un ensayo de recuperación *in vitro* para todas las sondas utilizadas tal como se describe a continuación.

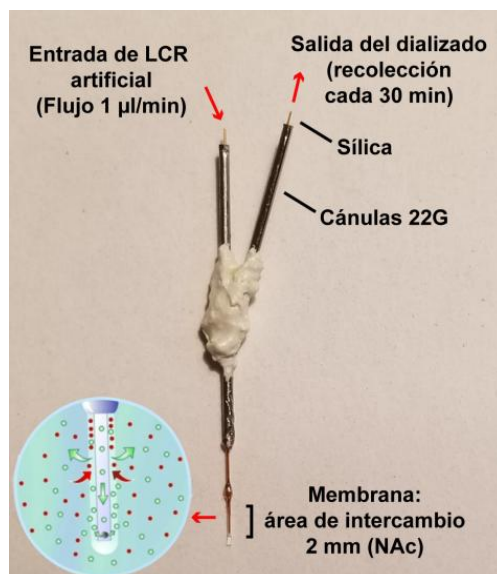


Figura 15. Sonda de microdiálisis construida en nuestro laboratorio. En la figura se muestran los capilares de sílice (sílicas) recubiertos por cánulas metálicas de calibre 22G a través de los cuales se perfundió la solución Ringer a flujo constante. Se indica el área de intercambio de 2 mm para NAc de rata.

3.3. Ensayo de recuperación *in vitro* para las sondas de microdiálisis

Para el ensayo de recuperación *in vitro*, las sondas fueron sumergidas en solución Ringer (NaCl, 145 nM; KCl, 4,0 nM; CaCl₂, 2,2 nM en agua purificada) que contenía una solución estándar del neurotransmisor de interés (glutamato o dopamina) a una concentración de 40 μM (Sigma Aldrich) mientras que la solución Ringer normal fue infundida a través de la sonda a flujo constante de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ a temperatura ambiente. Tras 60 min para favorecer el equilibrio a través de la membrana de diálisis, se recogieron dos muestras consecutivas cada 30 min y se cuantificó el neurotransmisor (glutamato o dopamina).

La recuperación *in vitro* se calculó comparando la concentración de neurotransmisor presente en la muestra recolectada con la concentración conocida de la solución en la que se sumergió la sonda. El porcentaje de recuperación *in vitro* obtenido fue de $(14 \pm 4)\%$.

3.4. Cirugía de implantación de sondas de microdiálisis

Transcurridos 20 días desde la primera exposición a estrés, los animales pertenecientes a cada grupo experimental fueron anestesiados bajo un protocolo que consiste en la administración de ketamina/xilazina a una dosis de 55 mg/kg i.p. y 11 mg/kg i.p., respectivamente. Posteriormente fueron colocados en un instrumento estereotáxico Stoelting. La barra dental incisiva fue ubicada a -3,3 mm por debajo de la línea interaural. El cráneo fue expuesto y los orificios necesarios para colocar las *probes* de microdiálisis fueron realizados con un torno de uso dental. Las cánulas de microdiálisis fueron implantadas unilateralmente en el NAc utilizando las siguientes coordenadas según Paxinos y Watson, 2007: NAc core: AP = +1,4 mm; L = +1,8 mm; DV = -7,8 mm y NAc shell: AP = +1,4 mm; L = 0,7 mm; DV = -8,2 mm. Las sondas fueron fijadas al cráneo con cemento dental (Meron; Voco GmbH, Cuxhaven, Alemania), un tornillo de acero inoxidable y cemento dental acrílico. Finalmente, los animales se recuperaron de la cirugía alojados individualmente durante 18-22 h.

3.5. Microdiálisis *in vivo*

Al día siguiente de la cirugía (día 21), el experimento de microdiálisis se realizó en animales despiertos y totalmente recuperados (figura 16). Las ratas se mantuvieron individualmente en *bowls* de acrílico y se les proporcionó libre acceso a comida y agua durante el experimento.

La sonda de microdiálisis se conectó a una bomba de microinfusión a través de un *tubing* de microdiálisis (FEP *tubing*). Las sondas se perfundieron con solución Ringer (en mM = NaCl, 145; KCl, 4,0; CaCl₂, 2,2; en agua purificada) a un flujo constante de 1 µl/min. Las muestras del dializado fueron recogidas cada 30 min en viales mantenidos a 4°C en un colector de fracciones refrigerado.

Al inicio del experimento, se recogieron cuatro muestras basales. Las muestras de la línea de base (*baseline*) se determinaron cuando cuatro muestras consecutivas difirieron en no más del 10%. Luego, todos los animales recibieron una inyección de solución salina i.p. y se recolectaron muestras durante 120 min. Posteriormente, las mismas ratas recibieron una inyección i.p. de cocaína (15 mg/Kg) y, finalmente, se recolectaron muestras de diálisis durante 150 min adicionales. La dosis de cocaína utilizada en este experimento fue la misma dosis empleada para expresar el fenómeno de sensibilización locomotora.

Se analizaron muestras de dializado de ratas individuales para detectar la presencia de dopamina o glutamato mediante cromatografía líquida de alta *performance* (HPLC). Los datos se graficaron como porcentaje (%) de cambio respecto a los valores de la línea de base

obtenidos. Al finalizar el experimento de microdiálisis, la colocación de la sonda fue verificada mediante estudios histológicos.

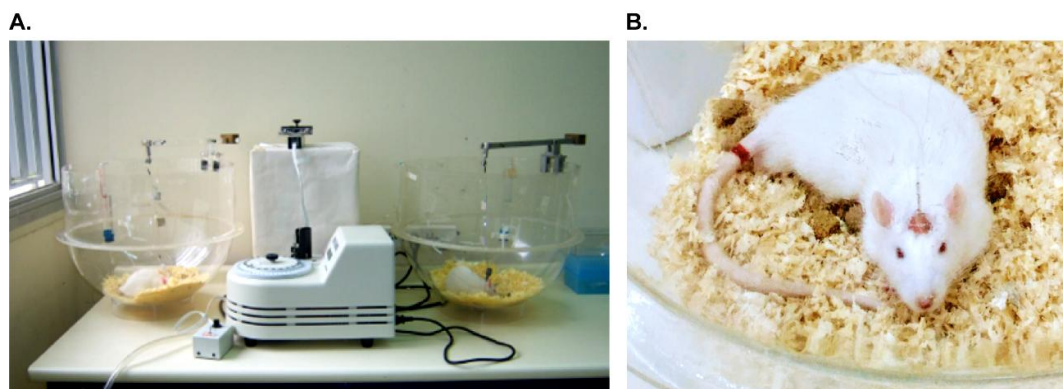


Figura 16. A-B) Microdiálisis *in vivo* en ratas de la cepa Wistar. Las fotografías fueron tomadas durante el desarrollo de los experimentos de la presente tesis en el Laboratorio de Microdiálisis del Dpto. de Farmacología, FCQ-UNC, IFEC-CONICET.

3.6. Microdiálisis *in vivo* por el método de *no net flux*

El *no net flux* es el método más aceptado para medir glutamato en condiciones basales (Chefer y col., 2009; Moussawi y col., 2011a). Esta técnica se basa en el agregado de concentraciones crecientes de glutamato exógeno (C_{in}) en la solución de diálisis que circula por la *probe* con el objetivo de encontrar el punto de equilibrio en el cual no existe flujo neto a través de la membrana de diálisis. En este punto de flujo neto cero, la concentración de glutamato ingresada y egresada de la *probe* son iguales ($C_{in}-C_{out} = 0$; $C_{in} = C_{out}$). Esto se debe a que las concentraciones de glutamato exógeno y glutamato extracelular del área cerebral de interés son equivalentes y logran un equilibrio a través de la membrana de diálisis.

Al día siguiente de la cirugía de implantación de la sonda de microdiálisis (día 21), el experimento de *no net flux* se realizó en animales despiertos y totalmente recuperados. La concentración basal de glutamato extracelular se determinó adicionando D-glutamato (Sigma-Aldrich) a la solución Ringer perfundida en la sonda de diálisis a concentraciones conocidas crecientes (superiores e inferiores a la concentración extracelular esperada), con el fin de generar una serie de puntos en un gráfico de regresión lineal. A partir de estos puntos experimentales se obtiene la recta que mejor se ajusta a dichos puntos y de la cual se extrapola el valor de $y = 0$ (punto en el que no hay flujo neto del analito hacia o desde la sonda) para obtener $x =$ concentración basal de glutamato.

Al inicio del experimento, la membrana de diálisis se perfundió con solución Ringer (en mM = NaCl, 145; KCl, 4,0; CaCl₂, 2,2; en agua purificada) y, 150 min después, se perfundió D-

glutamato a concentraciones crecientes de 2,5; 5,0; 10,0 y 20,0 μM en solución Ringer a través de la sonda a un flujo constante de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Los dializados se recogieron cada 30 min en viales mantenidos a 4°C en un colector de fracciones refrigeradas. Se obtuvieron cuatro muestras de diálisis para cada concentración de glutamato y se promediaron las tres últimas muestras para determinar el flujo neto de glutamato. Esto se debe a que se necesita un período de tiempo para restablecer el equilibrio entre el glutamato extracelular y el glutamato presente en la solución de diálisis a cada concentración utilizada. La concentración de glutamato en las muestras de diálisis obtenidas se determinó mediante HPLC. Al finalizar el experimento de microdiálisis, la colocación de la sonda fue verificada mediante estudios histológicos.

3.7. Determinación de dopamina por HPLC

Los dializados colectados fueron inyectados (volumen de inyección = 20 μl) en un equipo de HPLC con detección electroquímica (ECD) equipado con una columna de fase reversa RP 18 (C18, 125-4,6 mm, 5 mm de tamaño de partícula) y un detector coulométrico (ESA Coulochem II, Bedford, MA, USA) para la separación y detección de dopamina. Los potenciales de los electrodos utilizados fueron: celda de referencia (+350 mV), electrodo 1: +175 mV (oxidación), electrodo 2: -175 mV (reducción) de acuerdo con el método de Pontieri y col. (1995). La fase móvil utilizada (50 mM NaH_2PO_4 ; 5 mM Na_2HPO_4 ; 0,1 mM EDTA-Na; 0,5 mM octilsulfonato de sodio y 12% de metanol; pH = 5,5; en agua purificada) fue filtrada, degasificada e impulsada por una bomba (ESA Chemlmsford, MA, USA modelo 528) a un flujo de 1 ml/min a través de la columna. Bajo estas condiciones se observó rutinariamente un límite de detección para dopamina de 5 fmoles. Los picos fueron registrados y las alturas medidas con un sistema para análisis de datos cromatográficos EZ Chrome Elite (ESA, Inc., Chelmsford, MA, USA). Estos valores fueron comparados utilizando una curva de calibración de estándares externos de dopamina (Sigma-Aldrich).

El agua purificada utilizada para la preparación de la fase móvil y todas las soluciones analíticas fue sometida a un tratamiento de purificación adicional (*polishing*) a fin de reducir las corrientes de fondo de los electrodos y proporcionar una mayor sensibilidad en la detección electroquímica.

3.8. Determinación de glutamato por HPLC

Las muestras del dializado fueron inyectadas en un equipo de HPLC-ECD, equipado de una columna de fase reversa C 18 (Gemini N 3 μm ; 150 \times 4.6 mm; Phenomenex, USA) con precolumna y un detector electroquímico coulométrico (ESA Coulochem III, Chelmsford, MA,

USA) para la separación y determinación del contenido de glutamato. La fase móvil fue preparada con 100 mM de Na_2HPO_4 , 1,75% v/v de acetonitrilo y 20% v/v de metanol, el pH se ajustó a 6,67 con ácido fosfórico y fue impulsada por una bomba (Modelo 582; ESA, Chelmsford, MA, USA) a un flujo de 0,6 ml/min. El glutamato se cuantificó por derivatización con OPA/BME (o-ftalaldehído/o- β -mercaptoetanol) según lo descrito por Donzanti y Yamamoto (1988). Para ello, en el tubo de reacción se adicionó 7,5 μl del reactivo derivatizante (OPA/OME disuelto en *buffer* tetraborato, pH = 9,3) con 10 μl del eluato de microdiálisis. Después de 2 min de reacción, 10 μl del producto de la reacción fueron inyectados en el equipo de HPLC. El glutamato fue detectado utilizando un detector coulométrico compuesto de tres electrodos: una celda de referencia (+650 mV); un electrodo analítico de oxidación (+150 mV); y un electrodo analítico de reducción (+550 mV) de acuerdo con el método de Donzanti y Yamamoto (1988). Los picos fueron registrados y las alturas medidas con un sistema para análisis de datos cromatográficos EZ Chrome Elite (ESA, Inc.). Estos valores fueron comparados utilizando una curva de calibración de estándares externos de D-glutamato (Sigma-Aldrich).

El agua purificada utilizada fue sometida a un tratamiento de purificación adicional (*polishing*) tal como se explicó previamente.

Tanto el equipo ESA Coulochem II, empleado para la cuantificación de dopamina, como el equipo ESA Coulochem III, empleado para la determinación de glutamato, utilizan un método de reacción oxidación-reducción de los analitos y logran transformar el 100% de las muestras, característica que le confiere una alta sensibilidad y reproducibilidad al método, permitiendo la cuantificación de muestras de microdiálisis tomadas de pequeñas áreas cerebrales como el NAc.

3.9. Histología

Para verificar la localización de las cánulas implantadas en NAc core o NAc shell, los animales fueron sacrificados por decapitación con guillotina. Luego, los cerebros fueron removidos y fijados, por el método de inmersión, en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% p/v preparada con buffer fosfato (PB) 0,1 M. Todos los cerebros fueron seccionados en un criostato (Leica CM1510S, Alemania) en rebanadas coronales de ($40 \mu\text{m} \pm 2 \mu\text{m}$).

Las secciones coronales cerebrales fueron sometidas a tinción con violeta de cresilo y observadas en un microscopio óptico para la verificación de la correcta implantación de cánulas en el área de interés en referencia al atlas de Paxinos y Watson (2007), tal como se observa en la figura 17. Los animales cuyas *probes* fueron implantadas fuera de la región cerebral de interés fueron eliminados del análisis estadístico.

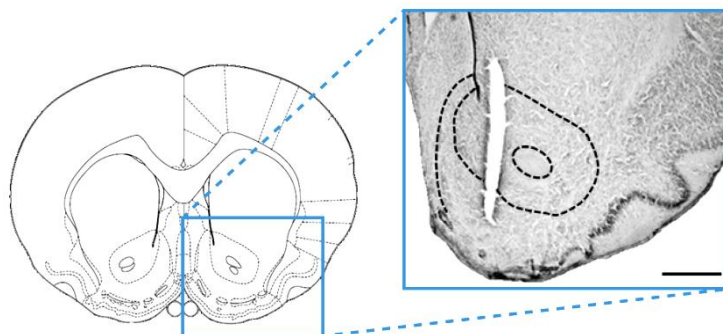


Figura 17. Estudio histológico para corroborar la localización de la sonda de microdiálisis. A la izquierda se observa una imagen del atlas de Paxinos y Watson (2007) correspondiente a Bregma +1,20 mm. A la derecha se observa una imagen de una rebanada de tejido cerebral, sometida a tinción con violeta de cresilo, tomada por microscopía óptica (objetivo 2,5X). En esta imagen se observa la localización de una sonda de microdiálisis en NAc core. La barra de escala corresponde a 1mm.

4. ESTUDIOS MICROSCÓPICOS

4.1. Densidad y morfología de las espinas dendríticas

4.1.1. Coloración de los procesos dendríticos de las MSNs de NAc core

Dos semanas después de la última sesión de estrés (día 21), los animales fueron anestesiados con ketamina/xilazina (55 mg/kg i.p. y 11 mg/kg i.p., respectivamente) y perfundidos intracardiácamente primero con solución PB a 4°C (0,1 M, pH = 7,4) y luego con una solución de PFA al 1,5% p/v a 4°C (disuelto en PB 0,1 M, pH = 7,4). Los cerebros fueron removidos y posfijados por inmersión en la misma solución de fijación que se empleó para la perfusión. Los cerebros se conservaron a 4°C en PFA al 1,5% p/v hasta ser seccionados. Posteriormente, los cerebros fueron lavados varias veces con *buffer* fosfato salino (PBS) 0,1 M y seccionados con vibrátomo (rebanadas coronales de 150 µm de espesor). Los cortes obtenidos fueron lavados con PBS 0,1 M y almacenados a 4°C hasta la coloración.

Con el fin de visualizar las espinas dendríticas de las MSNs a través de microscopía confocal, las secciones coronales conteniendo el área cerebral de interés fueron sometidas a tinción mediante la microinyección con pipetas de *patch* de una solución saturada del colorante fluorescente lipofílico 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato (DiI; Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) en aceite de pescado (Pozzo-Miller y col., 1999). Después de las inyecciones con DiI, los cortes fueron almacenados en PBS por 24 h a 4°C en la oscuridad para permitir la difusión del colorante. Posteriormente, los cortes fueron fijados con PFA al 4% p/v por 2 h a temperatura ambiente. Finalmente se procedió al lavado de los cortes

con PBS y al montaje de los mismos sobre portaobjetos usando como medio de montaje *Fluor Safe* (Millipore; Bellerica, MA, USA).

4.1.2. Adquisición de imágenes por microscopía confocal

Se tomaron imágenes de alta resolución de segmentos dendríticos individuales de las MSNs mediante el uso de un microscopio confocal de barrido laser Zeiss LSM 800 (Zeiss, Oberkochen, Alemania), utilizando el objetivo de inmersión de 60X 1.42 NA (Plan Apo).

El DiI fue excitado a 543 nm. Secciones ópticas en el eje Z fueron obtenidas a intervalos de 0.1 μm .

4.1.3. Análisis de la densidad de espinas dendríticas

Las espinas dendríticas fueron identificadas como protrusiones pequeñas que se extienden no más de 3 μm desde la dendrita parental y fueron contadas manualmente en las imágenes confocales obtenidas con el programa *Image J* (National Institute of Health, NIH, Bethesda, USA). La densidad de espinas dendríticas fue calculada como el número de espinas por segmento dendrítico y normalizado por 10 μm de dendrita.

4.1.4. Morfología de las espinas dendríticas

Las dimensiones geométricas de las espinas individuales fueron medidas manualmente en las imágenes confocales con el programa *Image J* (NIH) y utilizadas para la clasificación de las mismas (figura 18).

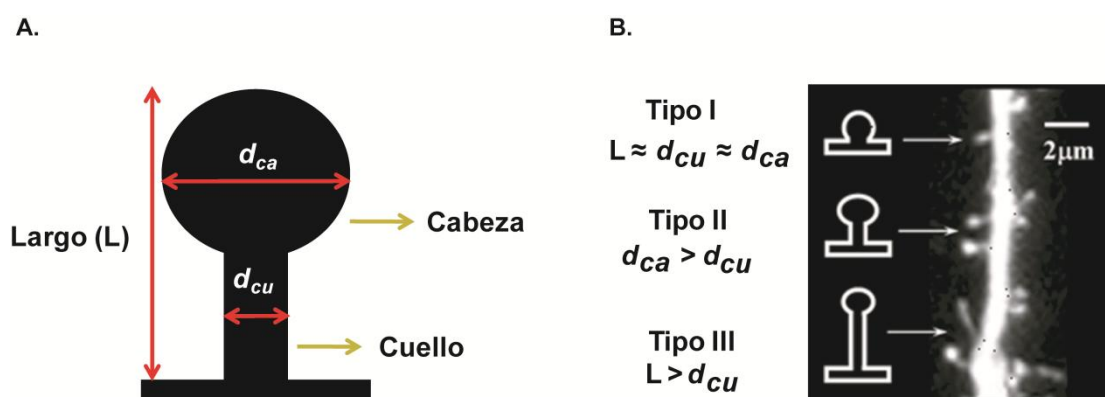


Figura 18. A) Medidas tomadas en las espinas dendríticas individuales. B) Clasificación de las espinas de acuerdo al largo de la espina, el diámetro máximo del cuello y el diámetro máximo de la cabeza (Chapleau y col., 2008; Tyler y Pozzo-Miller, 2003).

Las espinas dendríticas fueron clasificadas en tres categorías: espinas cortas de tipo I o *stubby*; espinas que se asemejan a hongos de tipo II o *mushroom*; y espinas finas, largas y con cabeza pequeña de tipo III o *thin* (Jones y Powell, 1969; Golden y Russo, 2012). Las espinas individuales fueron incluidas en cada categoría de acuerdo a la relación específica de L/d_{cu} y d_{ca}/d_{cu} , en donde L es el largo de la espina desde la base de la dendrita hasta la punta de la misma, d_{cu} es el diámetro máximo del cuello, y d_{ca} es el diámetro máximo de la cabeza (Calfa y col., 2012; Chapleau y col., 2008; Koh y col., 2002; Tyler y Pozzo-Miller, 2003).

4.2. Inmunofluorescencia

4.2.1. Preparación de tejidos

Dos semanas después de la última sesión de estrés (día 21), todos los animales fueron anestesiados con ketamina (55 mg/kg i.p.) y xilazina (11 mg/kg i.p.). Los animales fueron perfundidos intracardiácamente con *buffer* PB 0,1 M (pH = 7,40) que contenía heparina (15000 UI/l) y posteriormente con una solución de PFA al 4% p/v en PB 0,1 M para fijar el tejido. Luego, los cerebros fueron removidos y posfijados en la misma solución de fijación durante aproximadamente 16 h a 4°C y posteriormente fueron conservados en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% p/v en PB 0,1 M durante 72 h. Pasado este tiempo, se construyeron los tacos utilizando Cryoplast (Biopack) para facilitar su posterior sección en crióstato, los cuales fueron conservados a -70°C hasta su procesamiento. Finalmente fueron cortados en crióstato (Leica CM1510S) en secciones coronales de 20 μ m (\pm 2 μ m) de espesor y montados en portaobjetos gelatinizados para luego realizar la técnica de inmunofluorescencia (inmunomarcación secuencial de Iba-1, marcador de microglía, y GFAP, marcador de astrocitos).

4.2.2. Técnica de inmunofluorescencia

Las secciones cerebrales montadas en portaobjetos se hidrataron con PBS 0,1 M (pH = 7,4). Para evitar el enmascaramiento de los antígenos por fijación con soluciones que contienen aldehídos, la recuperación de antígenos se realizó añadiendo *buffer* citrato de sodio 10 mM (pH = 6,0) a 40°C a las secciones montadas en los portaobjetos mantenidas a 40°C en un baño de agua termostático durante 20 min. Luego, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 0,1 M. Inmediatamente después de bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos y realizar la permeabilización celular con suero de burro al 5% v/v (Laboratorio Natocor, Córdoba, Argentina) y Tritón X-100 al 0,1% v/v en PBS 0,1 M durante 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda, se procedió a la inmunomarcación secuencial de las proteínas de

interés. En primera instancia, las secciones se incubaron durante 20-24 h con anticuerpo primario policlonal *goat* anti-Iba-1 (Abcam, ab5076 1:200; Cambridge, MA, USA) a 4°C. Después de 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 0,1 M, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario *donkey* IgG anti-*goat* marcado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; A-11055, 1:800) durante 2 h a temperatura ambiente para detectar el anticuerpo primario anti-Iba-1. En segunda instancia, luego de 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 0,1 M, las secciones fueron incubadas durante 20-24 h con anticuerpo primario monoclonal *mouse* anti-GFAP (Sigma-Aldrich, G3893, 1:200) a 4°C. Después de 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 0,1 M, las secciones fueron incubadas con anticuerpo secundario *donkey* IgG anti-*mouse* marcado con el fluoróforo Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific, A10036, 1:800) durante 2 h a temperatura ambiente para detectar el anticuerpo primario anti-GFAP. Después de 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 0,1 M, los tejidos fueron incubados con dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol (tinción de ácido nucleico DAPI; Thermo Fisher Scientific, D1306, 300 nM en PBS) durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones fueron montadas con el reactivo *Fluor Safe* (Millipore) para protección de la fluorescencia y cubreobjeto.

4.2.3. Adquisición de imágenes por microscopía confocal

Las imágenes confocales fueron tomadas en NAc core. Secciones ópticas en el eje Z fueron obtenidas cada 1 μm de intervalo con una resolución de 1600×1600 píxeles y una velocidad de 8 μs /píxel utilizando un microscopio confocal de fluorescencia de barrido láser (Olympus FluoView FV1200, Tokio, Japón) con una lente de objetivo de inmersión en aceite (PLAPON60XO 60x/1.42oil). Se utilizaron longitudes de onda de excitación de 488 nm (para Alexa Fluor 488), 546 nm (Alexa Fluor 546) y 405 nm (para DAPI) para generar la emisión de fluorescencia en verde (microglía), rojo (astrocitos) y azul (núcleos celulares), respectivamente. La cuantificación del número de células microgliales, la intensidad de la fluorescencia de Iba-1 y GFAP y los parámetros morfológicos de la microglía mediante el Análisis de Sholl en NAc core de ambos hemisferios se realizaron utilizando el programa *Image J* (NIH).

4.2.4. Cuantificación del número de células microgliales

Las imágenes del *Z-stack* se convirtieron en una imagen de proyección de máxima intensidad usando *Image J* (NIH) y las células que expresan Iba-1 se identificaron y contaron manualmente en NAc core. La cuantificación del número de células fue llevada a cabo usando un tamaño de área idéntico (211,2 μm x 211,2 μm) e igual forma. Se analizaron un mínimo de 2

secciones cerebrales por animal teniendo en cuenta ambos hemisferios. Los resultados obtenidos fueron expresados como promedio final del conteo por área y condición experimental (número de células positivas Iba-1/mm²).

4.2.5. Medición de la intensidad de la fluorescencia

Para reducir el sesgo del operador en la medición, la intensidad de la fluorescencia en NAc core para Iba-1 y GFAP se realizó mediante una evaluación semiautomática basada en *threshold* y creación de una máscara utilizando un macro corrido en *Image J* (NIH). La máscara fue dirigida a su respectiva imagen de *Z-stack* convertida en proyección de intensidad de suma, donde se midió la intensidad de fluorescencia total (IFT). Las mediciones registradas para cada imagen se realizaron en un tamaño de área idéntico (211,2 μm x 211,2 μm) e igual forma. A la intensidad de fluorescencia total obtenida de cada imagen se le restó su fluorescencia de fondo. Finalmente se obtuvo un promedio de intensidad de fluorescencia por área de medición y condición experimental. Se analizaron al menos 2 secciones cerebrales (al menos 4 imágenes) por animal teniendo en cuenta ambos hemisferios cerebrales. El promedio de IFT de cada animal fue normalizado con el promedio del grupo control (No-Estrés/Veh) y los datos se expresaron como porcentaje (%) de cambio respecto al grupo control.

4.2.6. Morfología de la microglía: Análisis de Sholl

El estudio morfológico de la microglía se realizó en imágenes confocales del NAc core adquiridas como *Z-stacks* a partir de las secciones inmunomarcadas previamente y utilizando el *plugin* de Análisis de Sholl (*Image J*, NIH). Para reducir el sesgo del operador en la medición, se realizó una evaluación semiautomática utilizando un macro para el procesamiento de las imágenes que implicó, en primer lugar, la obtención de la proyección de máxima intensidad del canal Iba-1 positivo. A continuación, se incrementó la señal Iba-1 positiva observada en la proyección de máxima intensidad, seguida de una sustracción de la fluorescencia de fondo, para visualizar óptimamente todos los procesos de microglía. La imagen resultante se convirtió en imagen binaria y luego fue esqueletonizada. Los somas fueron reconstruidos teniendo como referencia la imagen confocal.

Se analizó un total de 80 células de NAc core seleccionadas al azar (como mínimo 2 células por imagen) para cada condición experimental. Se dibujaron sobre cada célula círculos concéntricos de radio creciente, centrados en el soma, comenzando en el borde del soma y aumentando equidistantemente 0,66 μm (5 píxeles) entre círculo, tal como se observa en la figura 19.

Para crear el gráfico de Sholl, cada célula fue analizada contando el número de intersecciones entre los procesos de la microglía y cada círculo concéntrico. A partir del Análisis de Sholl determinamos el máximo proceso (N_m , el número máximo de intersecciones para la célula), el número de ramas primarias (N_p , el número de ramas que se originaron en el soma de la microglía), la distancia máxima (μm , el radio máximo con un proceso de intersección), y la suma del número de intersecciones (complejidad de las ramas) para todos los anillos generados para cada célula. A partir de estos parámetros, se calculó el índice de ramificación de Schoenen (N_m/N_p) para cada célula con el fin de cuantificar la densidad de ramificación de las células (Reeves y col., 2011; Schoenen, 1982). Todos estos datos se utilizaron como medidas de la morfología de la microglía y están basados en literatura publicada (Fontainhas y col., 2011; Orr y col., 2009; Stence y col., 2001).

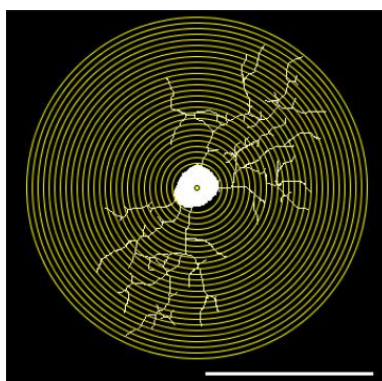


Figura 19. Imagen ilustrativa del Análisis de Sholl en una célula eskeletonizada. En la figura se observan los círculos concéntricos de radio creciente dibujados sobre una célula, centrados en el soma y aumentando equidistantemente $0,66 \mu\text{m}$ (5 píxeles) entre ellos. La barra de escala corresponde a $20 \mu\text{m}$.

5. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

5.1. Cuantificación de GLT-1

5.1.1. Preparación de tejidos

Dos semanas después de la última sesión de estrés (día 21), los animales fueron decapitados. La determinación de la expresión de la proteína GLT-1 se realizó en fracción de membrana.

En primer lugar, el NAc core fue disecado y el *pool* bilateral fue homogeneizado en $500 \mu\text{l}$ de *buffer* a 4°C que contenía Na HEPES y sacarosa ($0,32 \text{ M}$ de sacarosa, 1 mM de EDTA, 5 mM de Tris, $\text{pH} = 7,4$). El *buffer* se complementó con inhibidores de proteasas y fosfatasa

una proporción de 1:100. Los homogenatos se centrifugaron a 1000 g durante 10 min a 4°C. A continuación, los sobrenadantes fueron extraídos y centrifugados a 12000 g durante 20 min. El *pellet* resultante se resuspendió en 50 µl de *buffer* de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (150 mM NaCl, 0,1% v/v NP40, 0,5% p/v desoxicolato de sodio, 0,1% p/v dodecil sulfato de sodio (SDS), 50 mM de Tris, pH = 7,5) complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se realizó un paso final de centrifugación a 10000 g durante 5 min para eliminar el material insoluble. El *pellet* resultante se resuspendió en 30 µl de *buffer* Laemmli 2 x (4% p/v SDS, 20% v/v glicerol, 10% v/v β-mercaptoetanol, 125 mM Tris, pH = 6,8). Se utilizaron alícuotas de cada muestra para la cuantificación de proteínas totales según el método Bradford.

5.1.2. Western Blotting

Luego de los procedimientos previamente descritos, se evaluaron los niveles de las proteínas correspondientes mediante la técnica de inmunotransferencia.

Para llevar a cabo el Western blot, las muestras fueron sembradas (20 µg de proteína por carril) y separadas en un sistema de geles SDS-PAGE (BioRad Laboratories) con geles de poliacrilamida al 10%. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Fluoruro de polivinilideno, Amersham Hybond-P, General Electric). Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% p/v en *buffer* T-TBS (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Tween 20 0,01% v/v, pH = 7,6). Las membranas se incubaron durante 20-24 h a 4°C con el anticuerpo primario *rabbit* anti-GLT-1 (1:1000, número de catálogo 3838, Cell Signaling, Beverly, USA). Luego de 4 lavados de 15 min cada uno con T-TBS, las membranas se incubaron (1 h a temperatura ambiente) con el anticuerpo secundario *donkey* anti-*rabbit* conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (1:2000; Jackson Laboratories, Baltimore Pike, PA, USA).

Los datos se normalizaron teniendo en cuenta la expresión de la proteína β-actina que fue utilizada como control de carga y el promedio del grupo de control (No-Estrés/Veh). Para determinar la expresión de β-actina, las membranas se incubaron durante 20-24 h a 4°C con *goat* IgG policlonal anti-actina (1:500, sc 1616, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Luego de 4 lavados de 15 min cada uno con T-TBS, las membranas se incubaron (1 h a temperatura ambiente) con anticuerpo secundario *donkey* anti-*goat* conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (1:2000; Jackson Laboratories, Baltimore Pike, PA, USA).

El revelado se realizó por la técnica de quimioluminiscencia con luminol, ácido cumárico como catalizador y H₂O₂ como sustrato de reacción. El revelado se realizó en placas radiográficas (AGFA). La densidad óptica de las bandas fue analizada utilizando el programa *Image J* (NIH) y los resultados fueron normalizados respecto al grupo control. En todos los

casos se corroboró la especificidad de los anticuerpos primarios utilizados. Para ello, se determinó la presencia de una banda única que se corresponde con el peso molecular de la proteína estudiada.

5.2. Cuantificación de los niveles de ARNm de TNF- α e IL-1 β

5.2.1. Extracción de ARN

Dos semanas después del último episodio de estrés (día 21), los animales fueron decapitados, se disecó el NAc core y se agruparon las rebanadas bilaterales de cada animal. El ARN celular total se extrajo del tejido disecado mediante un procedimiento de extracción con tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo. Para ello, el *pool* bilateral de NAc core fue homogenizado con 500 μ l de reactivo Trizol (Thermo Fisher Scientific). Después de 15 min de incubación a 30°C, se agregó 100 μ l de cloroformo, se agitó enérgicamente y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Luego, el homogenato fue centrifugado a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa (capa superior) se extrajo, se le agregó 250 μ l de isopropanol con el fin de precipitar el ARN presente en la muestra y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Después de varios lavados consecutivos del *pellet* con 500 μ l de solución de etanol al 75% v/v a 4°C y centrifugarlo a 10000 rpm durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante. Finalmente, el *pellet* de ARN total se suspendió en 30 μ l de agua libre de ARNasa/ADNasa (Thermo Fisher Scientific) y se incubó 10 min a 60°C. La concentración total de ARN se midió por espectrofotometría a 260 nm empleando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). La relación de absorbancia de 260/280 nm se utilizó para evaluar la pureza del ácido nucleico extraído y medir el contenido total de ARN por muestra. Una relación mayor a 1,6 indicó una óptima extracción de ARN.

5.2.2. Transcripción reversa

Para realizar la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mensajero presente en la muestra, se añadieron 3 μ g de ARN total en un volumen final de 16,9 μ l previamente incubado durante 5 min a 70°C (fase de desnaturalización) a la mezcla de reacción que contenía 0,20 μ l de oligo dT (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina), 1 μ l de M-MLV transcriptasa reversa (Promega, Madison, WI, USA), 1,25 μ l de mezcla de dNTPs (10 mM cada dNTP; Thermo Fisher Scientific), 0,65 μ l de RNasin (Promega) y 5 μ l de *buffer* de reacción (Promega) por tubo de reacción (volumen final = 25 μ l). Las muestras se incubaron durante 60 min a 42°C para realizar la transcripción reversa. Después de la retrotranscripción, la

concentración de ADNc se midió mediante espectrofotometría a 260 nm empleando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific).

5.2.3. PCR en tiempo real

La expresión genética de TNF- α e IL-1 β se evaluó mediante la técnica de PCR en tiempo real semicuantitativa utilizando el equipo *Step One Plus* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) según Arroyo y col. (2018) con algunas modificaciones. Para llevar a cabo la reacción se añadieron 100 ng o 300 ng de ADNc, previamente transcrito por retrotranscripción, en un volumen final de 5 μ l para las mediciones de TNF- α o IL-1 β respectivamente, a una mezcla de reacción de 10 μ l de volumen final que contenía 7,5 μ l de *SYBR® green master mix* (Applied Biosystems), *primers* específicos (Sigma-Aldrich; sentido 0,15 μ l (10 μ M); antisentido, 0,3 μ l (10 μ M)) y 2,05 μ l de agua libre de ARNasa/ADNasa (Thermo Fisher Scientific). Para cada muestra experimental, se realizaron reacciones por duplicado o triplicado. Las condiciones de los ciclos de la PCR consistieron en 2 min a 50°C, 10 min a 95°C y luego 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min a 60°C. Las secuencias de los *primers* sentido (S) y antisentido (AS) utilizadas para detectar los genes diana se encuentran detalladas en la tabla 1. Se realizó el análisis de las curvas de *melting* para evaluar la uniformidad de la formación de productos de PCR, la formación de dímeros de *primers* y la amplificación de productos de PCR no específicos. La cuantificación relativa (RQ) se realizó utilizando el software StepOne™ V2.2.2 y el método $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde Ct corresponde al ciclo umbral para detectar la fluorescencia. Se determinó el Ct para cada reacción (dentro de la fase exponencial de amplificación). Los datos fueron expresados como veces de cambio en la expresión del gen de interés normalizado al estándar interno HPRT-1 y relativo a la expresión del gen del grupo experimental control (No-Estrés/Veh).

Gen de interés		Secuencia del <i>primer</i> (5'–3')	
TNF- α	S	5' AGCACGGAAAGCATGATCCG 3'	Tm: 62°C
	AS	5' CGAGCAGGAATGAGAAGAGG 3'	Tm: 62°C
IL-1 β	S	5' GACAAGAGCTTCAGGAAGGC 3'	Tm: 62°C
	AS	5' GCAAGACATAGGTAGCTGCC 3'	Tm: 62°C
HPRT-1	S	5' CTCGAAAGTGTGGATACAGGC 3'	Tm: 62°C
	AS	5' CTTGGCTTTTCCACTTTCGC 3'	Tm: 60°C

Tabla 1. *Primers* utilizados en la reacción de PCR en tiempo real. S: sentido. AS: antisentido. Tm: temperatura de *melting*.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los experimentos conductuales, estudios microscópicos, bioquímicos y neuroquímicos fue realizado mediante el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad, La Jolla, CA) utilizando Análisis de la Varianza (ANOVA) de dos o tres vías. Se utilizó el *test post-hoc* de Bonferroni para efectuar las múltiples comparaciones entre los grupos experimentales y $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las comparaciones de grupos simples se realizaron mediante *test-t* de dos colas no apareado. Todos los experimentos se replicaron al menos dos veces. Los datos se expresaron como media \pm SEM. Para más detalles, en la sección de resultados se especifica el análisis estadístico empleado para cada experimento y las significancias estadísticas.

RESULTADOS

1. Influencia de la exposición a estrés crónico sobre el efecto estimulante motor de cocaína y la liberación de dopamina en NAc core y shell.

Con el objetivo de validar el fenómeno de sensibilización cruzada entre estrés crónico y cocaína evaluamos la influencia de la exposición a estrés crónico sobre el efecto estimulante motor y la liberación de dopamina en NAc, core y shell, en respuesta a una dosis de cocaína de 15 mg/Kg administrada por vía i.p.

En primer lugar, los animales fueron sometidos a un paradigma de sensibilización inducido por la exposición repetida a estrés por restricción de movimiento y se evaluó la respuesta conductual a cocaína el día 21 del protocolo experimental, tal como se observa en la figura 9 de la sección de materiales y métodos. Los resultados mostraron que una sola inyección i.p. de cocaína de 15 mg/kg fue suficiente para producir sensibilización al efecto estimulante motor de cocaína en los animales previamente expuestos a estrés crónico, fenómeno que se evidenció dos semanas después del último episodio de estrés (figura 20). Con respecto a la respuesta conductual tras la inyección de solución salina, no se observaron cambios en la actividad locomotora al comparar los grupos experimentales ($p > 0,05$).

En la figura 20A se observan los recuentos de fotocélulas horizontales después de las inyecciones de salina y cocaína. Los resultados reportados entre los 10 y 60 min corresponden a la administración de solución salina i.p. al min 0 y los resultados reportados entre los 70 y 180 min corresponden a la administración de cocaína (15 mg/kg i.p.) luego de los 60 min. El ANOVA de dos vías de muestras repetidas a lo largo del tiempo reveló interacción significativa entre las variables estrés y tiempo (No-Estrés vs. Estrés x tiempo: $F_{(17,221)} = 1,88$; $p < 0,05$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,13)} = 6,05$; $p < 0,05$) y del tiempo ($F_{(17,221)} = 12,38$; $p < 0,0001$). El *test* de comparaciones múltiples de Bonferroni reveló diferencia significativa entre los animales No-Estrés y Estrés luego de la administración de cocaína a los 70, 80 y 90 min desde el inicio del experimento ($*p < 0,05$). Estos resultados ponen en evidencia el fenómeno de sensibilización conductual cruzada a cocaína en los animales previamente estresados.

Para demostrar el efecto de la inyección de cocaína en cada grupo experimental se realizó un *test-t* de dos colas no apareado comparando los datos a los 60 min (último registro de actividad locomotora en respuesta a solución salina) y a los 70 min (primer registro de actividad locomotora en respuesta a cocaína) desde el inicio del experimento. En ambos grupos experimentales se evidenció diferencia significativa (No-Estrés: $t_{12} = 2,32$; $^{\&}p < 0,05$ - Estrés: $t_{14} = 4,34$; $^{###}p < 0,001$), lo que demuestra el efecto estimulante motor de cocaína.

En la figura 20B se observa el recuento total de fotocélulas horizontales después de la inyección de salina o cocaína. El ANOVA de dos vías mostró interacción significativa entre las

variables estrés y droga (No-Estrés vs. Estrés x Sal vs. Coc: $F_{(1,26)} = 6,97$; $p < 0,05$), así como efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,26)} = 5,63$; $p < 0,05$) y de la administración de la droga (Sal vs. Coc: $F_{(1,26)} = 123,80$; $p < 0,0001$). El *test* de comparaciones múltiples de Bonferroni reveló efecto agudo de cocaína en cada grupo experimental (No-Estrés/Sal vs. No-Estrés/Coc: $^{\&}p < 0,05$ - Estrés/Sal vs. Estrés/Coc: $^{####}p < 0,0001$) y diferencia significativa entre las variables No-Estrés y Estrés en respuesta a la administración de cocaína (No-Estrés/Coc vs. Estrés/Coc: $^{**}p < 0,01$), lo que manifiesta el fenómeno de sensibilización conductual. Estos resultados son consistentes con los resultados previos de nuestro laboratorio realizados a partir de un protocolo similar al aquí empleado, los cuales evidenciaron sensibilización conductual a cocaína a largo plazo en animales previamente expuestos a estrés crónico (Esparza y col., 2012) o agudo (García-Keller y col., 2013).

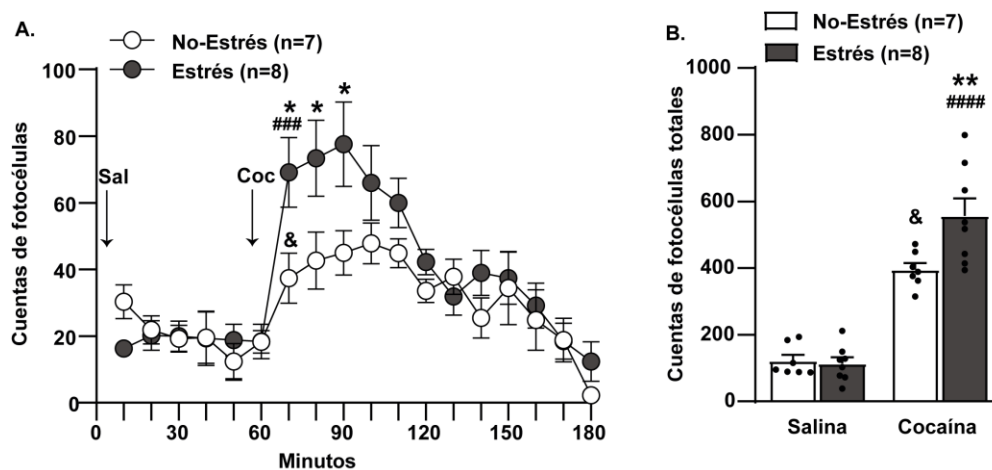


Figura 20. Actividad locomotora de animales previamente expuestos a estrés en respuesta a una dosis i.p. de cocaína de 15 mg/Kg. A) Cuentas de movimiento horizontal registradas por fotocélulas cada 10 min después de las inyecciones i.p. de salina y cocaína. B) Cuentas totales de movimiento horizontal registradas por fotocélulas después de la inyección i.p. de salina o cocaína. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. El número de animales pertenecientes a cada grupo experimental (n) se muestra entre paréntesis. (Sal = salina, Coc = cocaína).

En segundo lugar, se evaluaron los niveles extracelulares de dopamina en NAc, core y shell, frente a una inyección i.p. de cocaína empleando el mismo protocolo experimental y la misma dosis de la droga utilizados en el experimento conductual previamente realizado. El día 20 del protocolo experimental, los animales fueron sometidos a una cirugía para implantación de la *probe* de diálisis en NAc core o shell. Las muestras de dializado fueron extraídas mediante la técnica de microdiálisis *in vivo* y luego cuantificadas mediante HPLC con detección electroquímica.

Los resultados obtenidos demostraron una potenciación del incremento de dopamina extracelular inducido por cocaína en NAc core, pero no en shell, en los animales sometidos

previamente a estrés crónico en comparación con los controles No-Estrés (figura 21). La inyección i.p. de solución salina no modificó los niveles de dopamina extracelular en animales no estresados o estresados en ninguno de los dos compartimentos de NAc evaluados ($p > 0,05$).

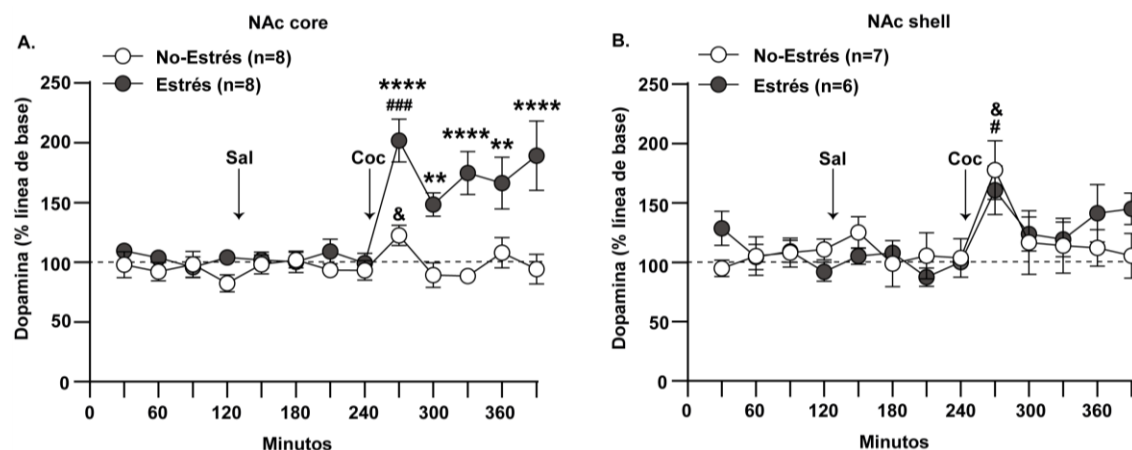


Figura 21. Efecto de una dosis i.p. de cocaína de 15 mg/Kg sobre los niveles de dopamina extracelular en animales previamente expuestos a estrés. A) Niveles de dopamina en NAc core. B) Niveles de dopamina en NAc shell. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. El número de animales pertenecientes a cada grupo experimental (n) se muestra entre paréntesis. (Sal = salina, Coc = cocaína).

Con el fin de establecer la línea de base de cada grupo experimental, al inicio del experimento se tomaron muestras de referencia durante 120 min. Se administró solución salina por vía i.p. a los 120 min, mientras que cocaína (15 mg/Kg i.p.) se inyectó a los 240 min (luego de la recolección de la última muestra en respuesta a salina).

En NAc core, el ANOVA de dos vías de muestras repetidas a lo largo del tiempo reveló interacción significativa entre las variables estrés y tiempo (No-Estrés vs. Estrés x tiempo: $F_{(12,168)} = 5,28$; $p < 0,0001$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,14)} = 24,75$; $p < 0,001$) y del tiempo ($F_{(12,168)} = 8,01$; $p < 0,0001$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni mostró diferencias entre los grupos No-Estrés y Estrés luego de la administración i.p. de cocaína a los 270, 330 y 390 min (**** $p < 0,0001$) y a los 300 y 360 min (** $p < 0,01$) desde el inicio del experimento. Estos resultados evidencian la especificidad de área cerebral en la que se expresa, a largo plazo, el fenómeno de sensibilización dopaminérgica en respuesta a cocaína en animales previamente expuestos a estrés crónico. Es interesante remarcar que el pico máximo de efecto estimulante de cocaína (15 mg/kg) sobre los niveles de dopamina extracelular en NAc core se correlaciona temporalmente con los efectos estimulantes motores de la droga observados en el experimento conductual de la figura 20A.

En contraste, en NAc shell, el ANOVA de dos vías de muestras repetidas a lo largo del tiempo no mostró interacción entre las variables estrés y tiempo (No-Estrés vs. Estrés x tiempo:

$F_{(12,132)} = 1,02$; $p > 0,05$), ni efecto del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,11)} = 0,09$; $p > 0,05$), pero evidenció un efecto significativo del tiempo ($F_{(12,132)} = 3,46$; $p < 0,001$).

Para evaluar el efecto de la inyección de cocaína en cada condición experimental y en ambos compartimentos de NAc, se realizó un *t-test* de dos colas no apareado comparando los datos obtenidos a los 240 min (última recolección de muestras en respuesta a solución salina) y 270 min (primera recolección de muestras en respuesta a cocaína) desde el inicio del experimento de microdiálisis. Este análisis demostró que la administración sistémica de cocaína es capaz de incrementar los niveles extracelulares de dopamina en ambos compartimentos de NAc (core: No-Estrés, $t_{14} = 2,46$; $^{\&}p < 0,05$ y Estrés, $t_{14} = 5,20$; $^{###}p < 0,001$ – shell: No-Estrés, $t_{12} = 2,51$; $^{\&}p < 0,05$ y Estrés, $t_{10} = 2,91$; $^{\#}p < 0,05$), efecto ligado a su mecanismo de acción.

Es importante destacar que los niveles de dopamina de la línea de base fueron equivalentes entre los animales no estresados y estresados para ambos compartimentos de NAc (línea de base en NAc core: No-Estrés = $15,04 \pm 2,80$ fmol/20 μ l y Estrés = $18,05 \pm 2,98$ fmol/20 μ l - línea de base en NAc shell: No-Estrés = $16,36 \pm 3,88$ fmol/20 μ l y Estrés = $24,96 \pm 1,64$ fmol/20 μ l) ya que el *test-t* de dos colas no apareado (No-Estrés vs. Estrés) no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales, ya sea en NAc core ($t_{14} = 0,74$; $p = 0,47$) o en NAc shell ($t_{11} = 1,92$; $p = 0,08$). Además, la inyección de solución salina no modificó la liberación de dopamina en animales no estresados o estresados en ninguno de los dos compartimentos de NAc ($p > 0,05$).

Al finalizar el experimento de microdiálisis se corroboró la localización de la *probe* de diálisis en la estructura de interés mediante un análisis histológico y se reconstruyó la ubicación de las *probes* de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2007) tal como se observa en la figura 22.

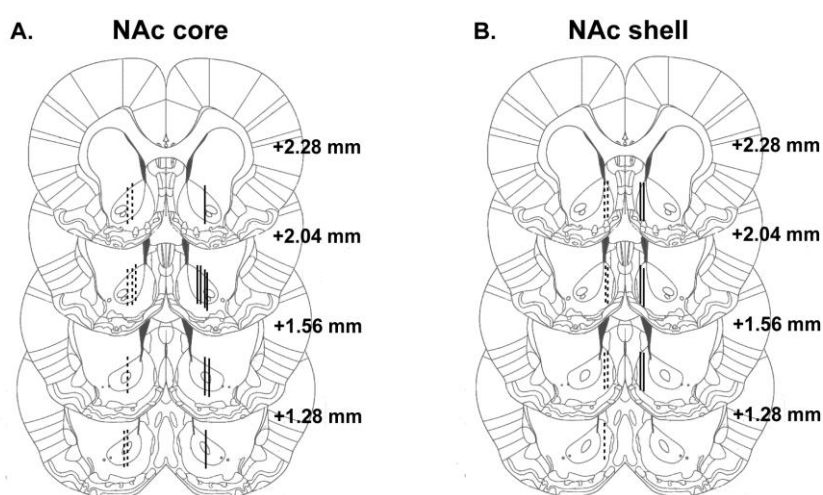


Figura 22. Ilustración de la ubicación de la membrana activa de la sonda de diálisis en NAc core (A) y shell (B) según Paxinos y Watson (2007). Las líneas discontinuas representan las ubicaciones de las sondas de diálisis del grupo No-Estrés y las líneas continuas representan las del grupo Estrés.

Importantemente, la respuesta dopaminérgica diferencial observada entre los compartimentos core y shell de NAc luego de la inyección de cocaína en los animales previamente estresados, reproducen los resultados previos del laboratorio reportados por García-Keller y col. (2013) con un paradigma de sensibilización cruzada estrés agudo-cocaína y los observados a largo plazo por Pachioni y col. (2007) en un modelo de sensibilización cruzada inducido por estrés agudo en respuesta a una dosis i.p. de anfetamina.

Conclusión parcial: Estos resultados indican que la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento induce, a largo plazo, el fenómeno de sensibilización cruzada al efecto estimulante motor de cocaína (15 mg/kg). Esta respuesta conductual alterada ocurre en paralelo a una potenciación del efecto estimulante de cocaína sobre la liberación de dopamina en NAc core, pero no en shell, en animales previamente expuestos a estrés. Ambos fenómenos fueron evidenciados dos semanas después del último episodio de estrés, lo que denota la persistencia de este proceso en el tiempo y, en parte, manifiesta el rol de NAc core a largo plazo en la sensibilización conductual.

2. Influencia de la exposición a estrés crónico en la homeostasis de glutamato en NAc core y shell.

Con el fin de explorar la capacidad de cocaína para inducir la liberación de glutamato, evaluamos el efecto de la exposición a estrés crónico sobre los niveles de glutamato extracelular en NAc, core y shell, en respuesta a la administración i.p. de cocaína (15 mg/Kg). Para ello, se empleó el mismo protocolo experimental que el utilizado en el experimento anterior. Las muestras fueron extraídas mediante la técnica de microdialisis *in vivo* y luego cuantificadas mediante HPLC con detector electroquímico.

Al inicio del experimento, se tomaron muestras de referencia durante 120 min para establecer la línea de base de cada grupo experimental. Transcurridos los 120 min, se administró solución salina y posteriormente, los mismos animales recibieron la inyección i.p. de cocaína a los 240 min desde el inicio del experimento.

En NAc core, el análisis de los resultados obtenidos mediante ANOVA de dos vías de muestras repetidas a lo largo del tiempo mostró interacción significativa entre las variables estrés y tiempo (No-Estrés vs. Estrés x tiempo: $F_{(12,156)} = 5,04$; $p < 0,0001$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,13)} = 12,47$; $p < 0,01$) y del tiempo ($F_{(12,156)} = 7,74$; $p < 0,0001$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni mostró diferencias significativas entre los grupos No-Estrés y Estrés luego de la administración sistémica de cocaína a los 330 (** $p < 0,01$), 360 y 390 min (**** $p < 0,0001$) desde el inicio del experimento.

En contraste, en NAc shell, el ANOVA de dos vías de muestras repetidas a lo largo del tiempo no reveló interacción entre las variables (No-Estrés vs. Estrés x tiempo: $F_{(12,120)} = 0,69$; $p > 0,05$) y tampoco efecto del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,10)} = 0,29$; $p > 0,05$). Sin embargo, se observó efecto significativo del tiempo ($F_{(12,120)} = 4,41$; $p < 0,0001$).

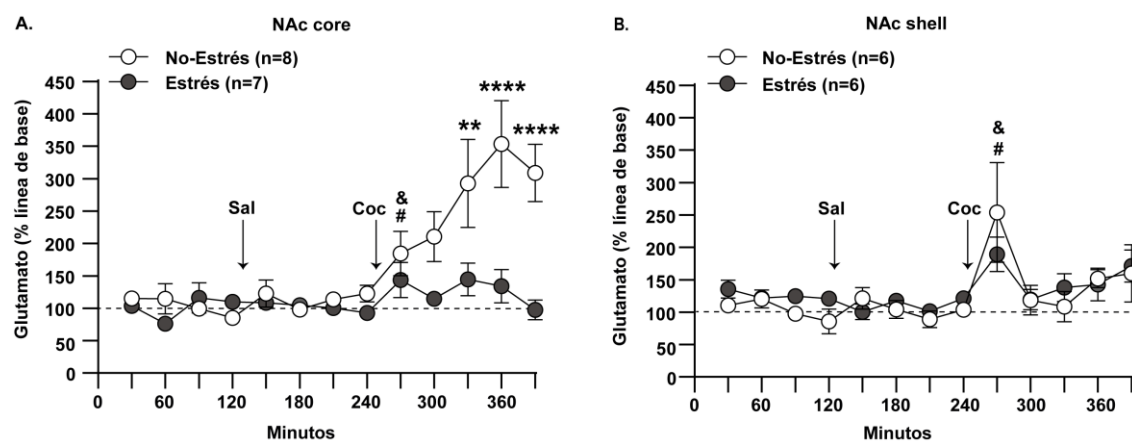


Figura 23. Efecto de una dosis i.p. de cocaína de 15 mg/Kg sobre la liberación de glutamato en animales previamente expuestos a estrés. A) Niveles de glutamato en NAc core. B) Niveles de glutamato en NAc shell. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. El número de animales pertenecientes a cada grupo experimental (n) se muestra entre paréntesis. (Sal = salina, Coc = cocaína).

La inyección de solución salina no modificó la liberación de glutamato en animales no estresados o estresados en ninguno de los dos compartimentos de NAc ($p > 0,05$).

Para evaluar el efecto de la inyección de cocaína en cada condición experimental y en ambos compartimentos de NAc, se realizó un *t-test* de dos colas no apareado comparando los datos obtenidos a los 240 min (última recolección de muestra en respuesta a solución salina) y 270 min (primera recolección de muestra en respuesta a cocaína) desde el comienzo del experimento de microdiálisis. El análisis estadístico demostró el incremento de los niveles extracelulares de glutamato luego de la inyección de la droga en ambos grupos experimentales y en ambos compartimentos de NAc (core: No-Estrés, $t_{14} = 2,29$; $^{\&}p < 0,05$ y Estrés, $t_{12} = 2,26$; $^{\#}p < 0,05$ – shell: No-Estrés, $t_{10} = 3,34$; $^{\&}p < 0,05$ y Estrés, $t_{10} = 2,45$; $^{\#}p < 0,05$). Sin embargo, como se observa en la figura 23A, la administración i.p. de cocaína desencadenó un marcado incremento de los niveles extracelulares de glutamato en NAc core en los animales No-Estrés, el cual se observó atenuado en los animales Estrés. Este efecto no se observó en NAc shell (figura 23B).

Al finalizar el experimento de microdiálisis se verificó la localización de la *probe* de diálisis en la estructura de interés de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2007) tal como se observa en la figura 24.

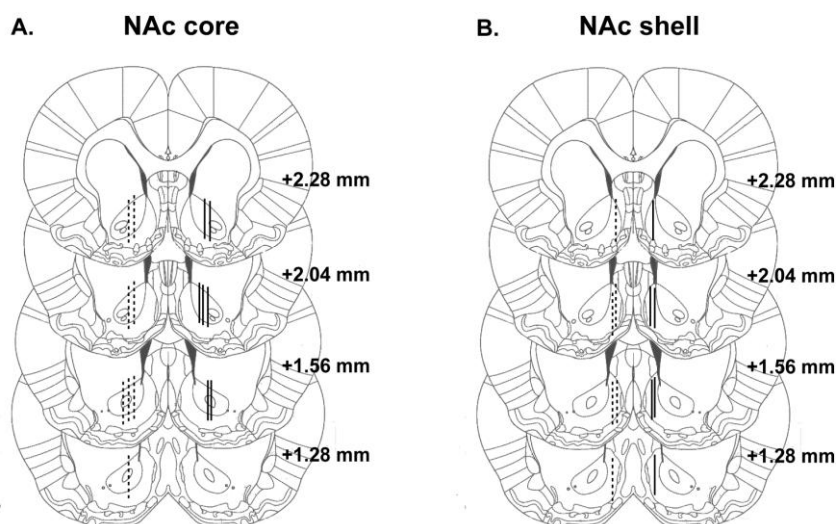


Figura 24. Ilustración de la ubicación de la membrana activa de la sonda de diálisis en NAc core (A) y shell (B) según Paxinos y Watson (2007). Las líneas discontinuas representan las ubicaciones de las sondas de diálisis del grupo No-Estrés y las líneas continuas representan las del grupo Estrés.

Interesantemente, cuando analizamos los niveles de glutamato de la línea de base de cada grupo experimental en ambos compartimentos de NAc, los animales del grupo Estrés mostraron una marcada tendencia al aumento de los niveles de línea de base de glutamato extracelular en NAc core con respecto a los animales no sometidos a estrés (línea de base en NAc core: No-Estrés = $24,63 \pm 10,36$ pmol/10 μ l y Estrés = $76,29 \pm 29,61$ pmol/10 μ l). Este efecto no fue observado en NAc shell (línea de base en NAc shell: No-Estrés = $34,86 \pm 15,31$ pmol/10 μ l y Estrés = $37,27 \pm 5,95$ pmol/10 μ l). El análisis estadístico de estos datos mediante un *test-t* de dos colas no apareado (No-Estrés vs. Estrés) para cada compartimento de NAc reveló que los niveles de glutamato de la línea de base no eran significativamente diferentes entre los grupos experimentales, ni en NAc core ($t_{13} = 1,74$; $p = 0,11$) ni en shell ($t_{10} = 0,15$; $p = 0,89$). Sin embargo, a pesar de que este análisis arroja datos aproximados, no constituye el método más preciso para determinar los niveles basales de un neurotransmisor.

El método de *no net flux* ha sido reportado como una de las variantes de la técnica de microdiálisis más aceptada para el monitoreo de niveles basales de neurotransmisores *in vivo* (Chefer y col., 2009; Moussawi y col., 2009). Dado que en NAc core se evidenció una marcada tendencia al aumento de los niveles de línea de base de glutamato extracelular, el siguiente experimento fue conducido con el fin de evaluar específicamente la concentración de glutamato basal en este compartimento de NAc. Para ello, se siguió el mismo protocolo experimental empleado en el experimento anterior. Inicialmente, la membrana de diálisis se perfundió con solución Ringer y se tomaron muestras de referencia a un flujo constante de 1 μ l/min. A los 150 min, se perfundió D-glutamato a concentraciones crecientes de 2,5; 5,0; 10,0 y 20,0 μ M en

solución Ringer a través de la *probe*. Las muestras recolectadas fueron cuantificadas mediante HPLC con detección electroquímica.

En la figura 25A se observan las curvas de regresión lineal de *no net flux* en NAc core (pendientes \neg No-Estrés: $0,74 \pm 0,05$, Estrés: $0,83 \pm 0,07$). El análisis de regresión lineal no mostró diferencias significativas entre las pendientes de la línea de regresión de la gráfica de *no net flux* ($F_{(1,86)} = 0,94$; $p = 0,34$). Los datos obtenidos de la extrapolación de la línea de regresión con el eje x de cada animal, perteneciente a cada grupo experimental, mostraron los siguientes valores promedios de las concentraciones basales de glutamato: No-Estrés ($2,58 \pm 0,44$) μM y Estrés ($5,47 \pm 0,86$) μM (figura 25B).

Efectivamente, la utilización del método de *no net flux* nos permitió corroborar el aumento de los niveles basales de glutamato en NAc core, en los animales previamente estresados. El análisis estadístico de la concentración basal de glutamato en NAc core mediante *test-t* de dos colas no apareado (No-Estrés vs. Estrés) reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales ($t_{16} = 2,82$; $*p < 0,05$).

Al igual que los experimentos neuroquímicos anteriores, al finalizar la microdiálisis se verificó la localización de la *probe* de diálisis en la estructura de interés (figura 25C).

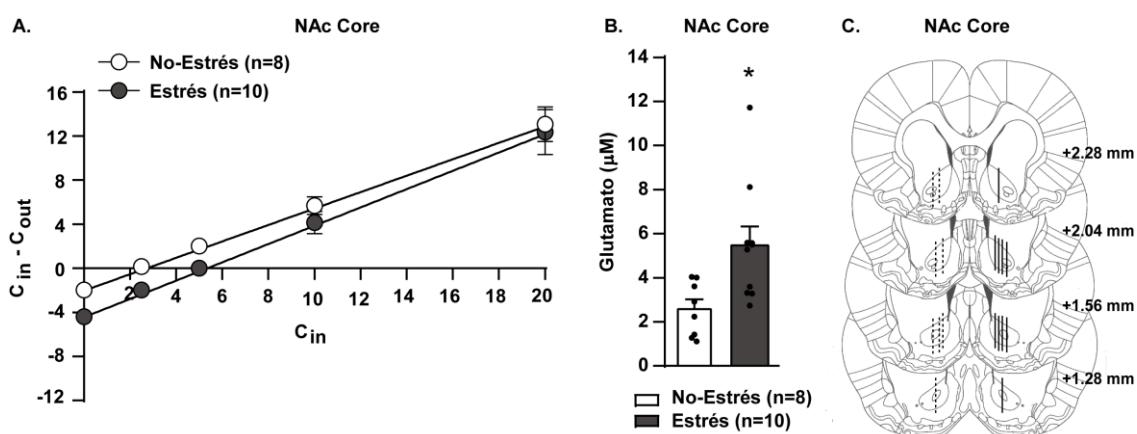


Figura 25. Monitoreo de los niveles basales de glutamato en NAc core. A) Curva de regresión lineal obtenidas mediante el método de *no net flux* y posterior cuantificación de glutamato por HPLC en NAc core. B) Concentración basal de glutamato obtenida por la extrapolación de la curva de regresión lineal con el eje x. C) Ilustración de la ubicación de la membrana activa de las *probes* de diálisis en NAc core según Paxinos y Watson (2007). Las líneas discontinuas representan las ubicaciones de las sondas del grupo No-Estrés y las líneas continuas representan las del grupo Estrés. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. El número de animales pertenecientes a cada grupo experimental (n) se muestra entre paréntesis.

Nuestros hallazgos observados en NAc core pueden atribuirse a una alteración en el transporte de glutamato. Dado que el GLT-1 es responsable de la recaptación del 90-94% del glutamato extracelular total, de fuentes sinápticas y extrasinápticas, en el cerebro anterior

(Danbolt, 2001) y que se expresa a elevadas concentraciones en NAc (Lehre y col., 1995), se determinó por *western blot* la expresión de GLT-1 en el compartimento core de NAc.

Consistentemente con el aumento de los niveles basales de glutamato en NAc core, nuestros resultados mostraron una reducción significativa de la expresión del transportador de glutamato GLT-1 en esta región cerebral en los animales pre-estresados en comparación con los no estresados (figura 26). El ANOVA de dos vías reveló un efecto principal y significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,28)} = 5,80$; $*p < 0,05$). No se evidenció efecto de la droga (Sal vs. Coc: $F_{(1,28)} = 0,66$; $p > 0,05$) ni interacción entre las variables (No-Estrés vs. Estrés x Sal vs. Coc: $F_{(1,28)} = 0,82$; $p > 0,05$). Importantly, estos resultados recapitulan los resultados previos del laboratorio reportados en animales previamente expuestos a estrés agudo (García-Keller y col., 2016).

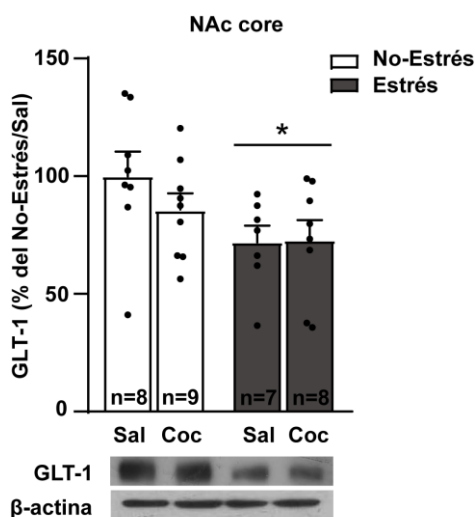


Figura 26. Nivel de expresión de GLT-1 en NAc core. El número de animales (n) pertenecientes a cada grupo experimental se muestra en las barras. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. (Sal = salina, Coc = cocaína).

Conclusión parcial: Estos resultados indican que la exposición crónica a estrés por restricción de movimiento atenúa la liberación de glutamato inducida por cocaína en NAc core, pero no shell, dos semanas después del último episodio de estrés. Estos resultados se asocian a un incremento en la concentración basal de glutamato extracelular en NAc core, el cual puede ser atribuido a una disminuida expresión de GLT-1 inducida por la exposición a estrés crónico en la misma región cerebral. En conjunto, estos resultados denotan una desregulación de la homeostasis glutamatérgica en NAc core, la cual se manifiesta por alteraciones en la liberación de glutamato en respuesta a cocaína y cambios en la recaptación de este neurotransmisor mediada por GLT-1.

3. Efecto de un tratamiento sistémico con minociclina sobre la sensibilización cruzada a cocaína inducida por estrés crónico.

Para evaluar si la microglía contribuye al desarrollo de la sensibilización conductual se evaluó la influencia de un tratamiento con minociclina, un inhibidor de la activación de la microglía (Tikka y col., 2001), sobre la expresión de la sensibilización conductual cruzada a cocaína inducida por estrés crónico. Para ello, se utilizó el esquema de tratamiento presentado en la figura 10 de la sección de materiales y métodos.

Como se observa en la figura 27A-B, el efecto estimulante motor de cocaína se potenció significativamente en los animales sometidos previamente a estrés, en comparación con los animales no estresados en respuesta a la administración no contingente de este psicoestimulante (15 mg/Kg i.p.), dos semanas después del último episodio de estrés. Interesantemente, el tratamiento con minociclina fue capaz de atenuar la potenciación de la actividad locomotora ante la inyección i.p. de cocaína en los animales sometidos a estrés. Con respecto a la respuesta conductual tras la inyección de solución salina, no se observaron cambios en la actividad locomotora al comparar los grupos experimentales ($p > 0,05$).

En la figura 27A se observa el recuento de movimiento horizontal registrado por fotocélulas después de las inyecciones i.p. de salina y cocaína. El tiempo transcurrido entre los 10 y 60 min corresponde a la administración de salina al min 0, mientras que el tiempo transcurrido entre los 70 y 180 min corresponde a la administración de cocaína (15 mg/kg i.p.) luego de los 60 min.

El ANOVA de tres vías de muestras repetidas a lo largo del tiempo reveló interacción significativa entre las variables estrés, tratamiento y tiempo (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino x tiempo: $F_{(17,374)} = 3,09$; $p < 0,0001$), interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,22)} = 5,08$; $p < 0,05$) y efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,22)} = 7,74$; $p < 0,05$), del tratamiento con minociclina (Veh vs. Mino: $F_{(1,22)} = 6,53$; $p < 0,05$) y del tiempo ($F_{(17,374)} = 37,35$; $p < 0,0001$). El análisis de comparaciones múltiples de Bonferroni mostró diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh a los 70 min ($****p < 0,0001$) y 80 min ($*p < 0,05$), lo que evidencia el fenómeno de sensibilización cruzada. Además, este análisis *post-hoc* evidenció diferencias significativas entre los grupos Estrés/Veh y Estrés/Mino a los 70 min ($++++p < 0,0001$), lo que demuestra la reversión de la sensibilización por el tratamiento con minociclina.

Para demostrar el efecto estimulante motor de cocaína, en cada grupo experimental se realizó un *test-t* de dos colas no apareado comparando los datos obtenidos a los 60 min (último registro en respuesta a salina) y a los 70 min (primer registro en respuesta a cocaína) desde el inicio del experimento. En todos los grupos experimentales se evidenció diferencia significativa

en respuesta a cocaína (No-Estrés/Veh: $t_{10} = 3,52$; $\&p < 0,01$; Estrés/Veh: $t_{10} = 4,89$; $###p < 0,001$; No-Estrés/Mino: $t_{12} = 3,197$; $\sim p < 0,01$; Estrés/Mino: $t_{12} = 3,34$; $\wedge p < 0,01$).

En la figura 27B se observa el recuento total de movimiento horizontal registrado por fotocélulas después de la inyección i.p. de salina o cocaína. El ANOVA de tres vías no evidenció interacción significativa entre las variables estrés, tratamiento y droga (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino x Sal vs. Coc: $F_{(1,44)} = 3,41$; $p > 0,05$). Sin embargo, este análisis reveló interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,44)} = 5,55$; $p < 0,05$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,44)} = 8,47$; $p < 0,01$), del tratamiento con minociclina (Veh vs. Mino: $F_{(1,44)} = 7,14$; $p < 0,05$) y de la administración de la droga (Sal vs. Coc; $F_{(1,44)} = 206,70$; $p < 0,0001$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni reveló el efecto estimulante motor de cocaína en todos los grupos experimentales (No-Estrés/Veh: $\&p < 0,01$; Estrés/Veh: $####p < 0,0001$; No-Estrés/Mino: $\sim p < 0,01$; Estrés/Mino: $\wedge p < 0,01$). Además, este análisis demostró diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh/Coc y Estrés/Veh/Coc ($**p < 0,01$), y entre los grupos Estrés/Veh/Coc y Estrés/Mino/Coc ($+++p < 0,001$).

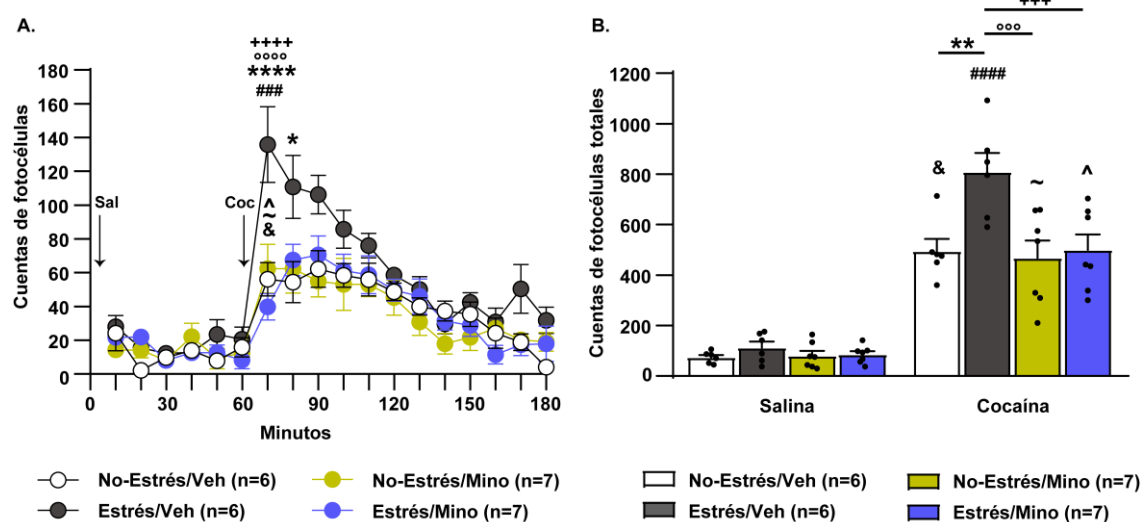


Figura 27. Efecto del tratamiento sistémico con minociclina sobre la actividad locomotora de animales previamente expuestos a estrés en respuesta a una dosis i.p. de cocaína de 15 mg/Kg. A) Cuentas de movimiento horizontal registradas por fotocélulas cada 10 min después de las inyecciones i.p. de salina y cocaína. B) Cuentas totales de movimiento horizontal registradas por fotocélulas después de la inyección i.p. de salina o cocaína. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. El número de animales pertenecientes a cada grupo experimental (n) se muestra entre paréntesis. (Sal = salina, Coc = cocaína, Veh = vehículo, Mino = minociclina).

Es importante destacar que, a pesar de que minociclina genera irritación en el área de inyección, no se evidenció un efecto *per se* de la misma sobre la actividad psicomotora. Este dato fue evidenciado a partir de la diferencia significativa entre los grupos Estrés/Veh y No-

Estrés/Mino tras la administración de cocaína (a los 70 min en la figura 27A; $^{oooo}p < 0,0001$ y en la figura 27B; $^{oo}p < 0,001$) y que no se reportaron diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y No-Estrés/Mino ($p > 0,05$).

Conclusión Parcial: Estos resultados demuestran que la microglía participa en los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la sensibilización cruzada entre la exposición a estrés y cocaína ya que minociclina, un potente inhibidor de la activación microglial, evitó la expresión de la sensibilización cruzada a cocaína en animales previamente expuestos a estrés crónico.

4. Efecto a largo plazo de la exposición a estrés crónico sobre la morfología y función de la microglía en NAc core: influencia de minociclina.

En respuesta a estímulos nocivos para el SNC, la microglía experimenta una serie de alteraciones morfológicas y funcionales que implica cambios en la respuesta inflamatoria de estas células (Walker y col., 2013, 2014). En este contexto y teniendo en cuenta que: 1) se observó un incremento de la concentración basal de glutamato en NAc core en los animales previamente expuestos a estrés crónico (experimento correspondiente al objetivo 2), 2) las variaciones en la concentración de glutamato extracelular son una señal de alarma crítica para la microglía (Mayhew y col., 2015) y, 3) estas células participan en la respuesta conductual sensibilizada tras la administración no contingente de cocaína en animales estresados (experimento correspondiente al objetivo 3); evaluamos los efectos a largo plazo del estrés crónico sobre la morfología y función de las células microgliales y la posible influencia de minociclina sobre estos efectos. Para ello, estudiamos parámetros morfológicos mediante el Análisis de Sholl, el número de células Iba-1 positivas y la inmunorreactividad de Iba-1 en NAc core utilizando el protocolo experimental presentado en la figura 10 de la sección de materiales y métodos. El día 21 del protocolo experimental se llevó a cabo la perfusión intracardiaca para fijar los cerebros. Posteriormente, se realizó la técnica de inmunofluorescencia y se tomaron las imágenes por microscopía confocal (para más detalles ver sección de materiales y métodos).

A fin de llevar a cabo el análisis morfológico de la microglía, realizamos el análisis de Sholl en las imágenes obtenidas, de las cuales se seleccionaron al azar 80 células de cada grupo experimental.

Nuestros resultados demostraron que la exposición repetida a estrés desencadenó una persistente hiper-ramificación de la microglía en NAc core observada 21 días después de la primera sesión de estrés. La gráfica del análisis de Sholl ilustra claramente una marcada diferencia en el perfil de ramificación de la microglía en los animales Estrés en comparación con los No-Estrés. La curva desplazada hacia la derecha evidencia un aumento en la

ramificación de los procesos microgliales en función de la distancia del soma. Interesantemente, el tratamiento con minociclina revirtió este efecto (figura 28D). El análisis estadístico del Análisis de Sholl mediante ANOVA de tres vías de muestras repetidas en función de la distancia del soma evidenció interacción significativa entre las variables estrés, tratamiento y distancia (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino x distancia: $F_{(60,18960)} = 13,32$; $p < 0,0001$), interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,316)} = 24,73$; $p < 0,0001$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,316)} = 19,57$; $p < 0,0001$), del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,316)} = 31,49$; $p < 0,0001$) y de la distancia ($F_{(60,18960)} = 497,5$; $p < 0,0001$).

A partir del Análisis de Sholl determinamos la máxima intersección (Nm, el número máximo de intersecciones para cada célula), el número de ramas primarias (Np, el número de ramificaciones que se originaron en el soma de cada célula microglial), la distancia máxima de intersección (μm , el radio máximo con la intersección de un proceso), la suma del número de intersecciones de todos los anillos generados para cada célula (complejidad de la ramificación) y el índice de ramificación de Shoenen (Nm/Np) con el fin de determinar la densidad de ramificación de cada célula.

Parámetro	Grupo experimental	Resultado
Nm	No-Estrés/Veh	13,40 \pm 0,56
	Estrés/Veh	19,56 \pm 0,60
	No-Estrés/Mino	13,51 \pm 0,60
	Estrés/Mino	13,10 \pm 0,59
Np	No-Estrés/Veh	4,20 \pm 0,20
	Estrés/Veh	4,76 \pm 0,17
	No-Estrés/Mino	4,23 \pm 0,16
	Estrés/Mino	4,36 \pm 0,20

Tabla 2. Resultados obtenidos al analizar los parámetros Nm y Np. El cuadro color rojo resalta el resultado estadísticamente diferente al resto de los grupos experimentales (No-Estrés/Veh vs. Estrés/Veh: **** $p < 0,0001$; Estrés/Veh vs. Estrés/Mino: +++ $p < 0,0001$ y Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: °°° $p < 0,0001$). Todos los datos se muestran como media \pm SEM. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

El análisis estadístico de Nm (tabla 2) mediante ANOVA de dos vías evidenció interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,316)} = 31,59$; $p < 0,0001$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,316)} = 24,16$; $p < 0,0001$) y del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,316)} = 29,46$; $p < 0,0001$). El análisis *post-hoc* de

Bonferroni reveló diferencias significativas entre los grupos No-estrés/Veh y Estrés/Veh (**** $p < 0,0001$), y entre los grupos Estrés/Veh y Estrés/Mino (**** $p < 0,0001$). No se evidenció un efecto *per se* del tratamiento con minociclina ya que se observaron diferencias entre los grupos Estrés/Veh y No-Estrés/Mino (°°°° $p < 0,0001$) y no se reportaron diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y No-Estrés/Mino ($p > 0,05$).

Con respecto al análisis estadístico de Np, el ANOVA de dos vías no evidenció interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,316)} = 1,31$; $p > 0,05$), ni efecto del estrés ($F_{(1,316)} = 3,55$; $p > 0,05$) o tratamiento ($F_{(1,316)} = 1,02$; $p > 0,05$). Es importante destacar que el número de ramificaciones primarias se correlaciona con el reportado por otros estudios (Beynon y col., 2012).

A partir de Nm y Np se calculó el índice de ramificación de Schoenen mediante el cociente entre ambos parámetros (figura 28E). Consistentemente con la curva del análisis de Sholl, el análisis estadístico del índice de ramificación mediante ANOVA de dos vías evidenció interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,316)} = 9,00$; $p = 0,003$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,316)} = 4,14$; $p = 0,04$) y del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,316)} = 13,57$; $p = 0,0003$). La prueba *post-hoc* de Bonferroni reveló diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh (** $p < 0,01$), y entre los grupos Estrés/Veh y Estrés/Mino (**** $p < 0,0001$), lo que evidencia el efecto de reversión de minociclina. No se evidenció un efecto *per se* del tratamiento con minociclina ya que se observaron diferencias significativas entre los grupos Estrés/Veh y No-Estrés/Mino (°°°° $p < 0,001$), y no se reportaron diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y No-Estrés/Mino ($p > 0,05$).

Por otro lado, la suma del número de intersecciones y la distancia máxima de intersección también se encontraron incrementados en los animales pre-estresados (figura 28F-G).

El análisis estadístico de la suma de intersecciones mediante ANOVA de dos vías evidenció interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,316)} = 30,87$; $p < 0,0001$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,316)} = 24,33$; $p < 0,0001$) y del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,316)} = 34,32$; $p < 0,0001$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni reveló diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh (**** $p < 0,0001$), y entre Estrés/Veh y Estrés/Mino (**** $p < 0,0001$). No se evidenció un efecto *per se* del tratamiento con minociclina ya que se observaron diferencias significativas entre Estrés/Veh y No-Estrés/Mino (°°°° $p < 0,0001$) y no se reportaron diferencias significativas entre No-Estrés/Veh y No-Estrés/Mino ($p > 0,05$) (figura 28F).

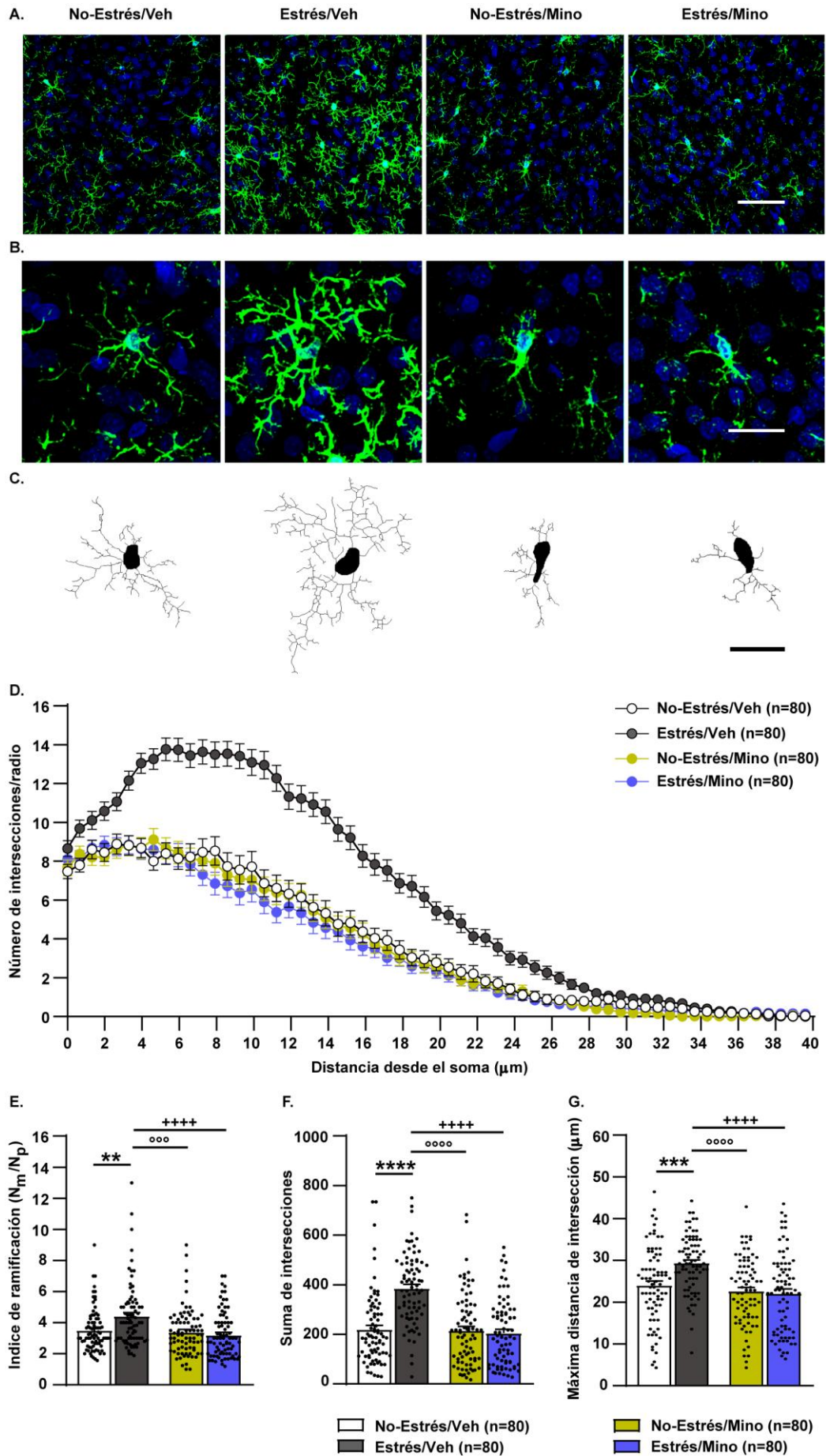


Figura 28. Efecto de la exposición a estrés crónico e influencia de un tratamiento sistémico con minociclina sobre la morfología de la microglía en NAc core. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cada grupo experimental obtenidas por microscopía confocal. Merge DAPI e Iba-1. La barra de escala corresponde a 50 μm . B) Imágenes representativas de una célula microglial de cada grupo experimental. La barra de escala corresponde a 20 μm . C) Imágenes representativas de la esqueletonización de una célula microglial de cada grupo experimental empleada para realizar el Análisis de Sholl. La barra de escala corresponde a 20 μm . D) Gráfico del Análisis de Sholl en el que se representa el número de intersecciones entre los procesos microgliales y cada anillo concéntrico en función de la distancia del soma. E) Índice de ramificación. F) Suma de intersecciones. G) Máxima distancia de intersección. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. El número de células pertenecientes a cada grupo experimental (n) se muestra entre paréntesis. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

El análisis estadístico de la máxima distancia de intersección mediante ANOVA de dos vías evidenció interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,316)} = 9,51$; $p < 0,01$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,316)} = 6,30$; $p < 0,05$) y del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,316)} = 20,89$; $p < 0,0001$). El análisis de comparaciones múltiples de Bonferroni reveló diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh (** $p < 0,001$) y entre los grupos Estrés/Veh y Estrés/Mino ($^{+++}p < 0,0001$). En el análisis de este parámetro tampoco se evidenció un efecto *per se* del tratamiento con minociclina (Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $^{ooo}p < 0,0001$ y No-Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $p > 0,05$) (figura 28G).

Consistentemente, todo este análisis reveló un incremento en el perfil de ramificación y la complejidad de las ramificaciones inducidos por estrés, sin cambios en el número de ramas primarias originadas en el soma de cada célula microglial. Además, en las células analizadas provenientes de animales estresados, se observó un incremento en la distancia máxima de intersección, parámetro relacionado con la extensión de los procesos microgliales.

El número de células microgliales se ha reportado incrementado en áreas cerebrales involucradas en el proceso adictivo tras la exposición a distintos protocolos experimentales de estrés (Wang y col., 2018; Nair y Bonneau, 2006).

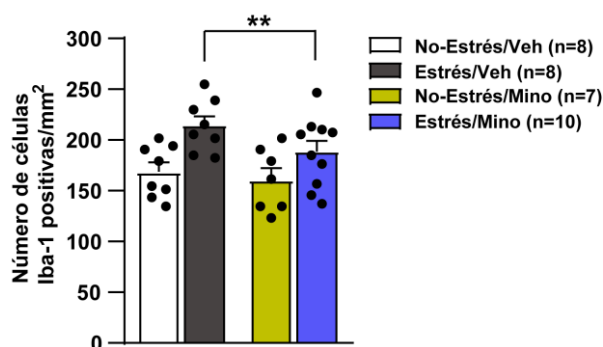


Figura 29. Efecto de la exposición a estrés crónico e influencia de un tratamiento sistémico con minociclina sobre el número de células Iba-1 positivas en NAc core. Los datos se muestran como media \pm SEM. El número de animales pertenecientes a cada grupo experimental (n) se muestra entre paréntesis. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

Consistentemente, nuestros resultados evidenciaron un incremento en el número de células Iba-1 positivas. Sin embargo, minociclina no fue capaz de restaurar este evento celular (figura 29). El ANOVA de dos vías demostró efecto principal del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,29)} = 12,27$; $**p < 0,01$). Sin embargo, el análisis estadístico no evidenció interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,29)} = 0,73$; $p > 0,05$) ni efecto significativo del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,29)} = 2,62$; $p > 0,05$).

Para evaluar la actividad de la microglía, cuantificamos la inmunoreactividad de la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Iba-1). Iba-1 es un marcador microglial expresado por células microgliales tanto reactivas como quiescentes (Kettenmann y col., 2011), y los cambios en su expresión han sido correlacionados con alteraciones en la actividad microglial (Ito y col., 1998, 2001). En consonancia con las alteraciones morfológicas observadas en la microglía, los resultados demostraron que los animales previamente expuestos a estrés crónico mostraron un aumento significativo de la inmunoreactividad de Iba-1 en NAc core cuando se compararon los resultados con los de animales que no habían sido sometidos a estrés (figura 30B).

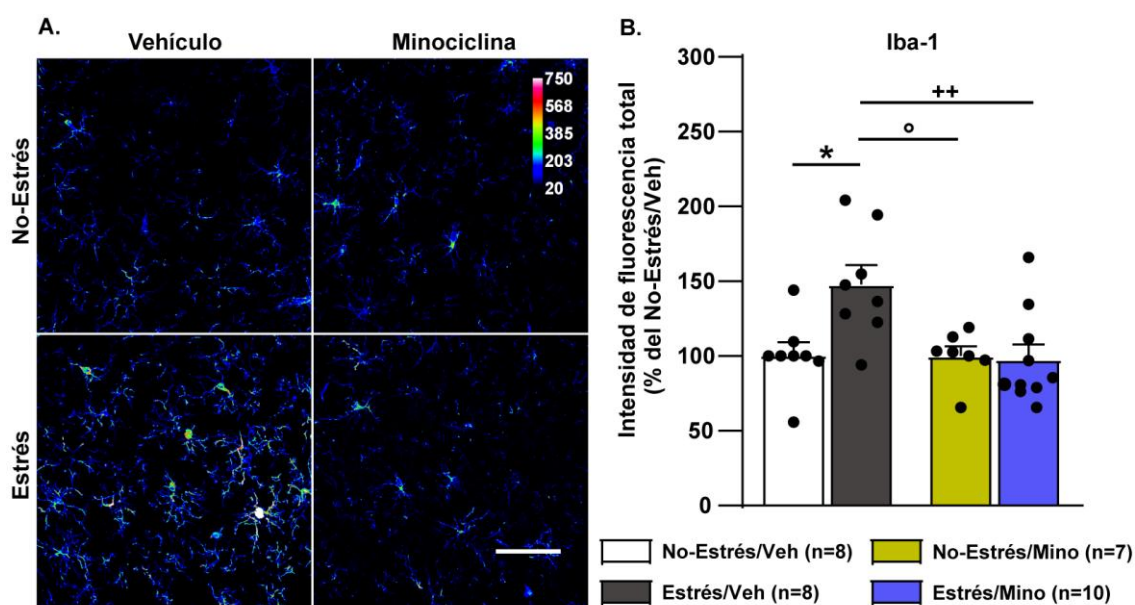


Figura 30. Efecto de la exposición a estrés crónico e influencia de un tratamiento sistémico con minociclina sobre la expresión de Iba-1 en NAc core. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cada grupo experimental obtenidas por microscopía confocal. LUT: Rainbow. La barra de escala corresponde a 50 μ m. B) Intensidad de fluorescencia total de Iba-1 en NAc core. Los datos se muestran como media \pm SEM. El número de animales pertenecientes a cada grupo experimental (n) se muestra entre paréntesis. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

El análisis de la intensidad de fluorescencia total de Iba-1 en NAc core mediante ANOVA de dos vías demostró interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento

(No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,29)} = 6,00$; $p < 0,05$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,29)} = 4,94$; $p < 0,05$) y del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,29)} = 6,32$; $p < 0,05$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni reveló diferencias significativas entre los grupos No-estrés/Veh y Estrés/Veh ($*p < 0,05$), y entre los grupos Estrés/Veh y Estrés/Mino ($^{++}p < 0,01$), lo que evidencia el efecto restaurador del tratamiento con minociclina. No se evidenció un efecto *per se* del tratamiento con minociclina ya que se observaron diferencias significativas entre los grupos Estrés/Veh y No-Estrés/Mino ($^{\circ}p < 0,01$), y no se reportaron diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y No-Estrés/Mino ($p > 0,05$).

La exposición a eventos estresantes es capaz de cambiar el microambiente neuroinmune hacia un inmunofenotipo proinflamatorio (Frank y col., 2012). Teniendo en cuenta este contexto, determinamos la expresión del ARNm que codifica para TNF- α e IL-1 β en NAc core ya que ambas citoquinas proinflamatorias se han reportado alteradas tras la exposición a estrés (Frank y col., 2012). Para realizar este experimento, empleamos el mismo protocolo experimental (figura 10 de la sección materiales y métodos) con la diferencia de que el día 21 se llevó a cabo la disección de NAc core. Posteriormente, se realizó la extracción de ARN total, seguida de transcripción reversa de ARNm para obtener ADNc. El nivel de expresión de ARNm para cada citoquina fue cuantificado mediante PCR real time (para más detalles ver sección de materiales y métodos).

Los resultados demostraron que el estrés crónico indujo un aumento persistente del ARNm que codifica para TNF- α en esta región cerebral (figura 31A). El análisis de datos mediante ANOVA de dos vías demostró interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,23)} = 5,21$; $p < 0,05$), efecto del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,23)} = 15,06$; $p < 0,001$) y del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,23)} = 11,10$; $p < 0,01$). El *test post-hoc* de Bonferroni reveló diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh ($**p < 0,01$), y entre los grupos Estrés/Veh y Estrés/Mino ($^{++}p < 0,01$). No se evidenció un efecto *per se* del tratamiento con minociclina ya que se observaron diferencias significativas entre los grupos Estrés/Veh y No-Estrés/Mino ($^{\circ\circ}p < 0,001$), y no se reportaron diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y No-Estrés/Mino ($p > 0,05$).

En contraste, aunque se observó una marcada tendencia de aumento con respecto al ARNm que codifica para IL-1 β en los animales previamente estresados (figura 31B), el análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías no mostró interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,23)} = 1,66$; $p > 0,05$) y tampoco efecto del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,23)} = 3,92$; $p > 0,05$) o del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,23)} = 2,14$; $p > 0,05$).

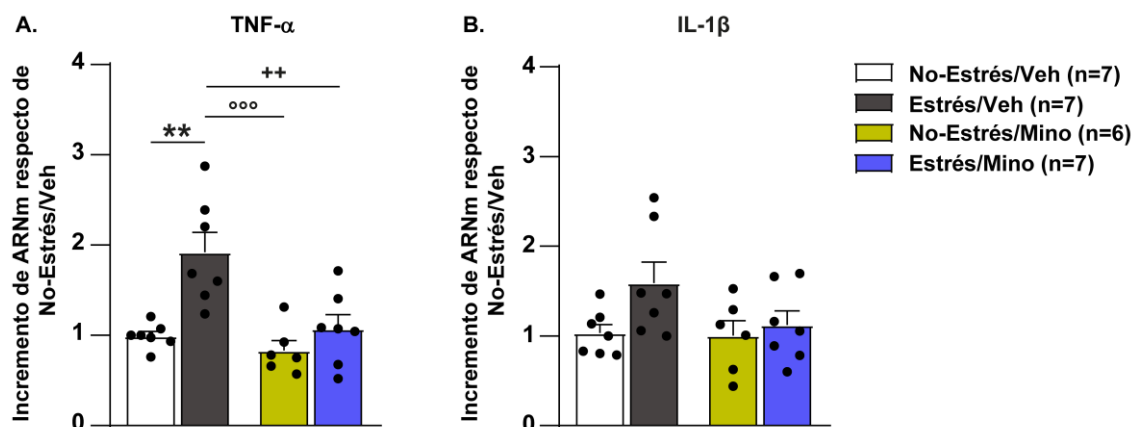


Figura 31. A-B) Efecto de la exposición a estrés crónico e influencia de un tratamiento sistémico con minociclina sobre los niveles de ARNm que codifican para TNF- α e IL-1 β en NAc core. Los datos se muestran como media \pm SEM. El número de animales pertenecientes a cada grupo experimental (n) se muestra entre paréntesis. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

Conclusión Parcial: En conjunto, estos datos sugieren que la exposición a estrés crónico induce un perfil de hiper-ramificación de la microglía en NAc core, el cual se acompaña de un persistente incremento de la inmunoreactividad de Iba-1 y de los niveles de ARNm que codifican para TNF- α . Además, el tratamiento sistémico con minociclina, por su capacidad para inhibir la activación microglial y su efecto anti-inflamatorio, es capaz de restaurar no sólo las alteraciones morfológicas y la expresión de Iba-1, sino también los niveles de ARNm de TNF- α en los animales previamente estresados.

5. Estudio de la participación de la microglía en los cambios inducidos por la exposición a estrés crónico sobre la homeostasis de glutamato en NAc core mediante un tratamiento sistémico con minociclina.

En el objetivo 2 demostramos la desregulación de la homeostasis de glutamato inducida por estrés crónico, siendo uno de los rasgos distintivos el aumento de la concentración basal de glutamato extracelular en NAc core. Este cambio homeostático ha sido atribuido a una disminución en la captación de glutamato debido a una reducción en la expresión de GLT-1 en esa región cerebral.

Para estudiar si la microglía participa en esta alteración, determinamos la concentración basal de glutamato extracelular mediante el método de *no net flux* y la expresión de GLT-1 en NAc core después de un tratamiento sistémico con minociclina. Para ello, se utilizó el protocolo experimental presentado en la figura 10 de la sección de materiales y métodos. Con el fin de llevar a cabo el monitoreo de glutamato extracelular basal en NAc core, se realizó la cirugía de

implantación de la sonda de diálisis el día 20, y el día 21 se realizó la técnica de microdiálisis *in vivo* mediante el método de *no net flux*. Por otro lado, en otro grupo de animales, el día 21 del protocolo experimental se llevó a cabo la disección de NAc core para luego cuantificar GLT-1 por *western blot*. Para más detalles ver la sección de materiales y métodos.

En la figura 32A se observan las rectas de regresión lineal obtenidas en el experimento de *no net flux* en NAc core (pendientes - No-Estrés/Veh: $0,70 \pm 0,04$, Estrés/Veh: $0,73 \pm 0,07$, No-Estrés/Mino: $0,75 \pm 0,03$, Estrés/Mino: $0,76 \pm 0,05$). El análisis de regresión lineal no evidenció diferencias significativas entre las pendientes ($F_{(3,162)} = 0,24$; $p = 0,87$), lo que indica una recuperación *in vivo* equivalente entre las *probes*.

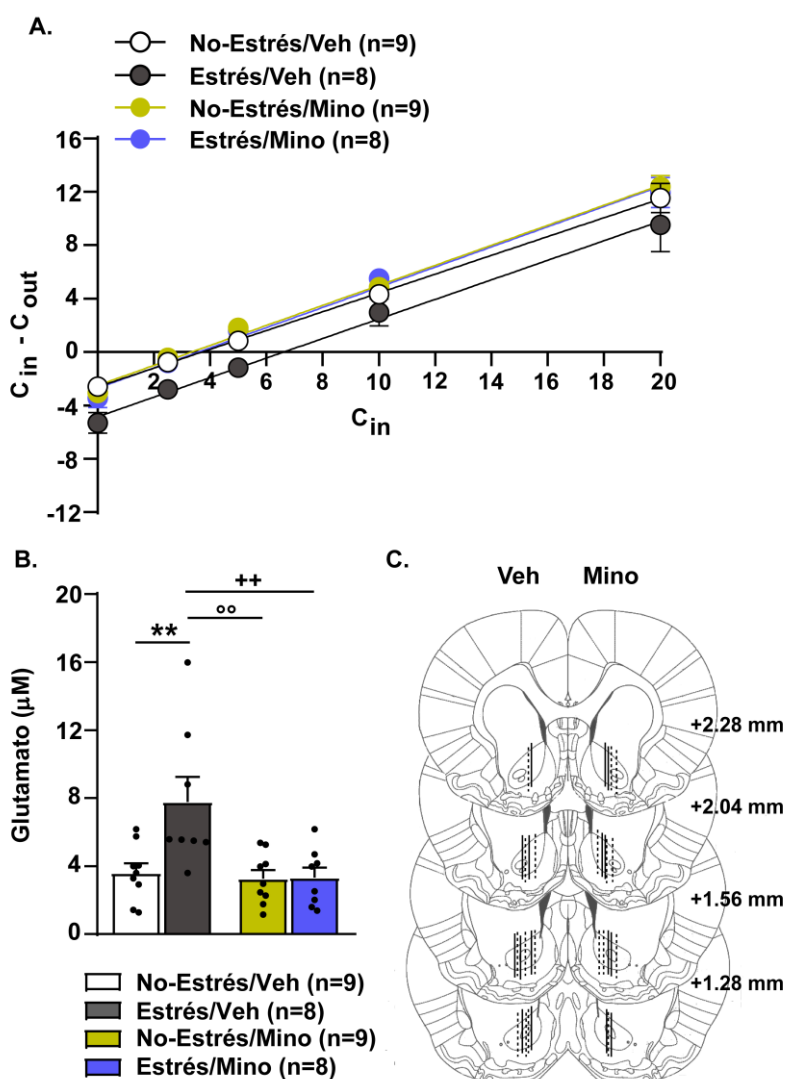


Figura 32. Influencia de un tratamiento sistémico con minociclina sobre los niveles basales de glutamato en NAc core. A) Curvas de regresión lineal obtenidas mediante el método de *no net flux* y posterior cuantificación de glutamato por HPLC en NAc core. B) Concentración basal de glutamato obtenida por la extrapolación de la curva de regresión lineal con el eje x. C) Ilustración de la ubicación de la membrana activa de las *probes* de diálisis en NAc core según Paxinos y Watson (2007). Las líneas discontinuas representan las ubicaciones de las sondas de diálisis en

el grupo No-Estrés y las líneas continuas representan las del grupo Estrés. En el hemisferio izquierdo se observan las localizaciones de las *probes* en los animales tratados con vehículo, mientras que en hemisferio derecho se observan las de los animales tratados con minociclina. Los datos se muestran como media \pm SEM. El número de animales pertenecientes a cada grupo experimental (n) se muestra entre paréntesis. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

Al igual que nuestros resultados previos, evidenciamos que el glutamato extracelular basal en NAc core permanece elevado hasta dos semanas después de la última exposición a estrés (figura 32B). Las concentraciones de glutamato basal corresponden a la intersección entre la línea de regresión ajustada a los puntos obtenidos experimentalmente y el eje x, lo que representa el punto en el que no hay flujo neto de glutamato hacia o desde la membrana de la *probe* de diálisis. Los datos obtenidos de la extrapolación de la línea de regresión de cada animal perteneciente a cada grupo experimental con el eje x mostraron las siguientes concentraciones basales de glutamato: No-Estrés/Veh ($3,61 \pm 0,56$) μ M, Estrés/Veh ($7,77 \pm 1,47$) μ M, No-Estrés/Mino ($3,26 \pm 0,50$) μ M, Estrés/Mino ($3,32 \pm 0,60$) μ M. El análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de dos vías reveló interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,30)} = 5,88$; $p < 0,05$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,30)} = 6,21$; $p < 0,05$) y del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,30)} = 8,01$; $p < 0,01$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni reveló diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh (** $p < 0,01$), y entre Estrés/Veh y Estrés/Mino ($^{++}p < 0,01$). No se evidenció un efecto *per se* del tratamiento con minociclina (Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $^{\circ}p < 0,01$ y No-Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $p > 0,05$).

Estos resultados se correlacionaron con una significativa reducción de la expresión del transportador GLT-1 inducida por estrés en NAc core (figura 33).

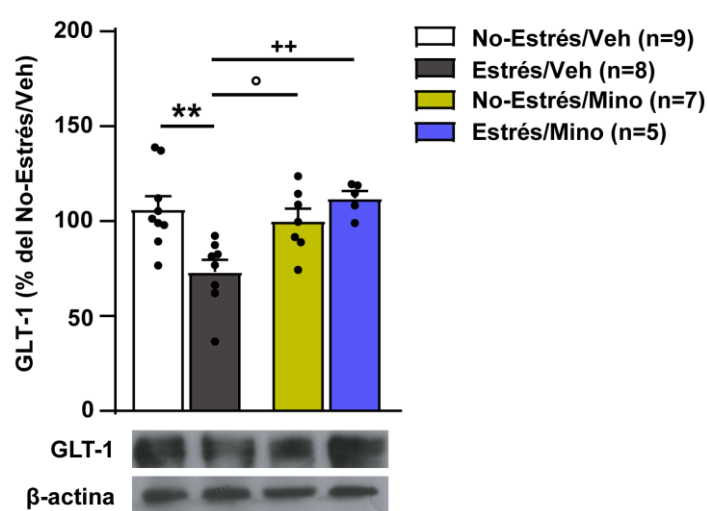


Figura 33. Nivel de expresión de GLT-1 en NAc core. El número de animales (n) pertenecientes a cada grupo experimental se muestra en las barras. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

El análisis estadístico de los resultados mediante ANOVA de dos vías reveló interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,25)} = 11,53$; $p < 0,01$) y efecto principal del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,25)} = 6,06$; $p < 0,05$). Sin embargo, este análisis no evidenció efecto del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,25)} = 2,56$; $p > 0,05$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni reveló diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh (** $p < 0,01$), y entre Estrés/Veh y Estrés/Mino ($^{++}p < 0,01$). No se evidenció un efecto *per se* del tratamiento con minociclina (Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $^{\circ}p < 0,05$ y No-Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $p > 0,05$).

Dado que el transportador GLT-1 se encuentra altamente expresado en astrocitos y que estas células ejercen una regulación directa de la transmisión glutamatérgica, determinamos la inmunoreactividad de GFAP (marcador de astrocitos) en NAc core. Para ello, se utilizó el mismo protocolo experimental (figura 10 de la sección de materiales y métodos). Para realizar el análisis de GFAP se tomó el canal GFAP positivo de las mismas imágenes de inmunofluorescencia tomadas por microscopía confocal para el objetivo 4 (para más detalles ver sección de materiales y métodos).

Los resultados revelaron una marcada disminución de la inmunoreactividad de GFAP en NAc core (figura 34B).

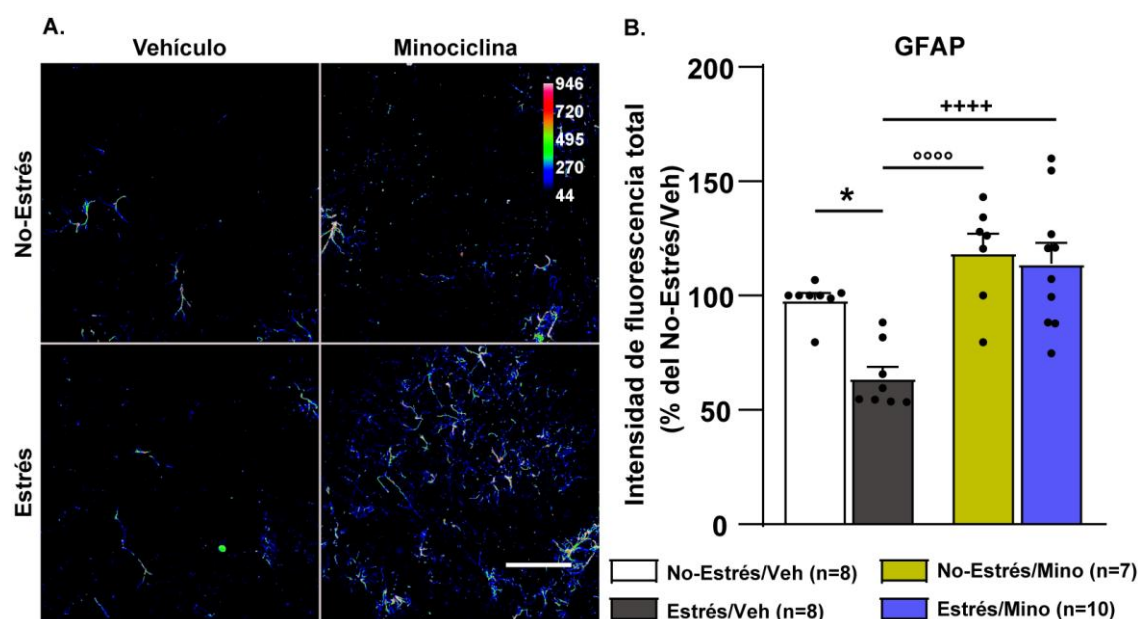


Figura 34. Efecto de la exposición a estrés crónico e influencia de un tratamiento sistémico con minociclina sobre la expresión de GFAP en NAc core. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cada grupo experimental obtenidas por microscopía confocal. LUT: *Rainbow*. La barra de escala corresponde a 50 μm . B) Intensidad de fluorescencia total de GFAP en NAc core. Los datos se muestran como media \pm SEM. El número de animales pertenecientes a cada grupo experimental (n) se muestra entre paréntesis. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

El análisis de los datos mediante ANOVA de dos vías demostró interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,29)} = 4,36$; $p < 0,05$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,29)} = 7,60$; $p < 0,01$) y del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,29)} = 24,90$; $p < 0,0001$). El análisis de comparaciones múltiples de Bonferroni reveló diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh ($*p < 0,05$), y entre los grupos Estrés/Veh y Estrés/Mino ($^{+++}p < 0,0001$). No se evidenció efecto *per se* del tratamiento con minociclina (Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $^{\circ\circ\circ}p < 0,0001$ y No-Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $p > 0,05$).

Conclusión parcial: *El resultado más destacado obtenido en estos experimentos es que el tratamiento con minociclina restablece la homeostasis glutamatérgica en NAc core, lo que indica que la persistente desregulación de la homeostasis de glutamato inducida por la exposición a estrés crónico en NAc core depende de la participación de la microglía. Más aun, dado que el tratamiento con minociclina es capaz de restaurar la expresión de GLT-1 y GFAP, y consecuentemente normalizar la concentración basal de glutamato extracelular en NAc core, estas evidencias colocarían a la microglía cascada arriba de la acción de astrocitos en el mecanismo de desregulación de la homeostasis de glutamato.*

6. Estudio de la participación de la microglía sobre los cambios en la morfología de espinas dendríticas inducidos por la exposición a estrés crónico empleando un tratamiento sistémico con minociclina.

La sensibilización conductual y la reinstalación de la conducta de búsqueda de drogas han sido asociadas a modificaciones estructurales duraderas en los circuitos neuronales que conforman el circuito de la motivación. Una de las formas más robustas de plasticidad neuronal relacionada con la exposición repetida a psicoestimulantes es la reorganización persistente de las espinas dendríticas (Robinson y Kolb, 1997).

En términos generales, las espinas dendríticas se clasifican en *thin*, *stubby* o *mushroom*. Las espinas *thin*, cuya longitud total es mayor que el ancho de su cabeza y cuyo ancho de cabeza es mayor que el ancho de su cuello, se consideran espinas plásticas inmaduras. Las espinas *stubby*, cuya longitud total es casi igual al diámetro de su cabeza, son las menos comprendidas en relación a estructura y función aunque se las considera generalmente como elementos sinápticos plásticos e inmaduros. Las espinas tipo *mushroom*, cuyo ancho de cabeza es mayor que el de su cuello, son consideradas espinas maduras y establecen fuertes contactos sinápticos. Este tipo de espinas también muestran importantemente un aumento de la expresión de receptores AMPA a lo largo de PSD respecto de las espinas *stubby* (Golden y Russo, 2012).

La relevancia de la caracterización de las espinas dendríticas por tipo (es decir, *thin*, *mushroom* o *stubby*) radica en que las distintas categorías morfológicas tienen propiedades fisiológicas diferenciales y pueden reflejar la importancia funcional de la plasticidad dependiente de la experiencia (Golden y Russo, 2012; Holtmaat y Svoboda, 2009). Por ejemplo, la actividad sináptica en espinas dendríticas individuales ha sido vinculada directamente a su remodelación estructural (Matsuzaki y col., 2004). Así, cambios morfológicos en las espinas dendríticas pueden representar cambios funcionales tal como alteraciones en la fuerza sináptica (Harris y Kater, 1994).

Para llevar a cabo este experimento se utilizó el protocolo experimental presentado en la figura 10 de la sección de materiales y métodos. El día 21, se realizó la perfusión intracardíaca para fijar los cerebros. Posteriormente, se realizó la tinción de las espinas dendríticas con DiI y se tomaron las imágenes por microscopía confocal (para más detalles ver sección de materiales y métodos).

En la figura 35A se observa la distribución de densidad de espinas totales y de espinas según su clasificación morfológica en *thin*, *mushroom* o *stubby* en NAc core.

El análisis de los resultados de la densidad de espinas totales mediante ANOVA de dos vías reveló interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,14)} = 17,48$; $p < 0,001$) y efecto significativo del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,14)} = 30,50$; $p < 0,0001$). Sin embargo, este análisis no se evidenció efecto del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,14)} = 2,76$; $p > 0,05$). El *test* de comparaciones múltiples de Bonferroni evidenció diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh (** $p < 0,01$), y entre los grupos Estrés/Veh y Estrés/Mino (++++ $p < 0,0001$). Minociclina no manifestó efecto *per se* sobre la densidad de espinas totales (Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: °°° $p < 0,001$ y No-Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $p > 0,05$).

En cuanto a la densidad de espinas tipo *thin*, el análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías reveló efecto principal del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,14)} = 26,47$; ^{vv} $p < 0,001$), mientras que no evidenció interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,14)} = 0,72$; $p > 0,05$), ni efecto del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,14)} = 0,14$; $p > 0,05$).

En relación a la densidad de espinas tipo *stubby*, el ANOVA de dos vías de los resultados obtenidos reveló interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,14)} = 7,89$; $p < 0,05$), pero no mostró efecto del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,14)} = 0,84$; $p > 0,05$) o del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,14)} = 1,38$; $p > 0,05$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p > 0,05$).

Interesantemente, el análisis de los resultados de la densidad de espinas tipo *mushroom* mediante ANOVA de dos vías reveló interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,14)} = 11,49$; $p < 0,001$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,14)} = 9,75$; $p < 0,001$) y del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,14)} = 12,15$; $p < 0,001$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni demostró diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh (** $p < 0,01$), y entre los grupos Estrés/Veh y Estrés/Mino ($^{++}p < 0,01$). Minociclina no manifestó efecto *per se* en la densidad de este tipo de espinas (Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $^{\circ}p < 0,01$ y No-Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $p > 0,05$).

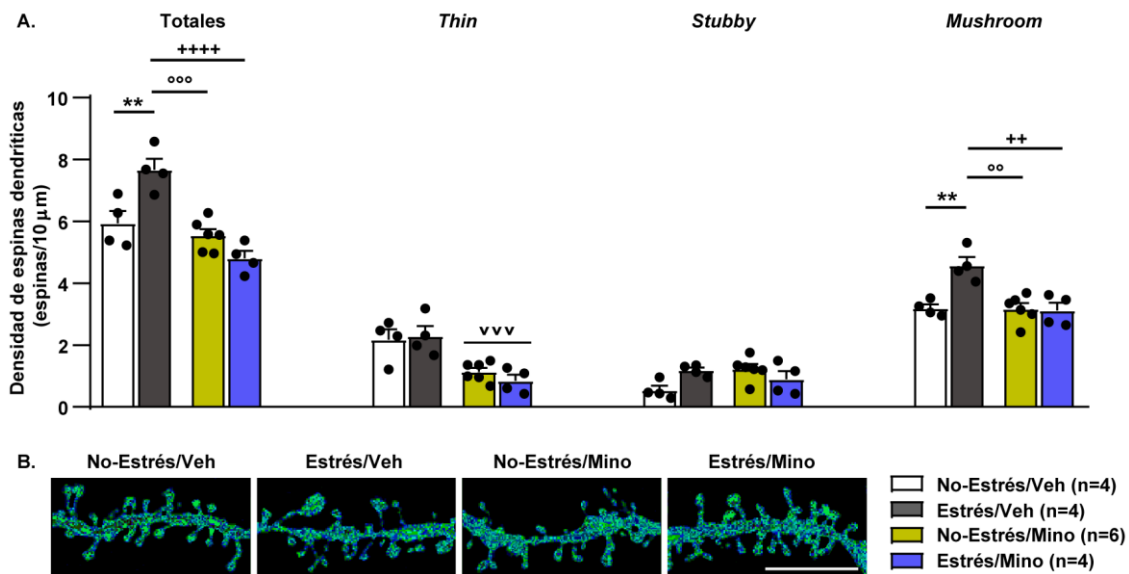


Figura 35. Efecto de la exposición a estrés crónico e influencia de un tratamiento sistémico con minociclina sobre la densidad de espinas dendríticas en NAc core. A) Densidad de espinas totales, *thin*, *stubby* y *mushroom* cada 10 μm. El número de animales (n) pertenecientes a cada grupo experimental se muestra entre paréntesis. Todos los datos se muestran como media ± SEM. Total de μm analizados por grupo experimental: No-Estrés/Veh (610 μm), Estrés/Veh (633 μm), No-Estrés/Mino (827 μm), Estrés/Mino (623 μm). B) Imágenes representativas de un segmento dendrítico con espinas de NAc core de cada grupo experimental. La barra de escala representa 10 μm.

Conclusión parcial: *Los resultados indican un aumento de la densidad de espinas dendríticas totales y de tipo mushroom en NAc core inducido por la exposición a estrés crónico. Estas evidencias son consistentes con el incremento persistente de la concentración basal de glutamato observado en los experimentos de los objetivos 2 y 4 en la misma región cerebral. Importantemente, estos hallazgos demuestran que el tratamiento con minociclina impide esta remodelación estructural, un evento probablemente ligado a la restauración de la homeostasis glutamatérgica mediante el tratamiento sistémico con minociclina.*

7. Influencia de un tratamiento sistémico con minociclina sobre la autoadministración de cocaína en animales previamente expuestos a estrés crónico.

Con el objetivo de determinar si la microglía contribuye a la influencia del estrés sobre la administración contingente de cocaína, evaluamos la conducta de autoadministración en animales previamente estresados y sometidos a un tratamiento crónico con minociclina. Para ello, se empleó el protocolo experimental presentado en la figura 11 de la sección de materiales y métodos.

Los resultados mostraron un efecto facilitador del estrés crónico sobre la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína. La facilitación inducida por estrés se demostró cuantificando el número de presiones de la palanca activa e infusiones de cocaína durante un protocolo de autoadministración de 10 días (figura 36A-B). El análisis de datos correspondiente al número de presiones de la palanca activa, mediante ANOVA de tres vías de muestras repetidas en función del tiempo, evidenció interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,36)} = 7,41$; $p < 0,01$) y efecto significativo del tiempo ($F_{(9,324)} = 11,98$; $p < 0,0001$). Sin embargo, este análisis no reportó interacción entre las variables tiempo, estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino x tiempo: $F_{(9,324)} = 0,48$; $p > 0,05$).

En cuanto a las infusiones de cocaína, el análisis de los resultados obtenidos, mediante ANOVA de tres vías de muestras repetidas en función del tiempo, evidenció interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,36)} = 4,84$; $p < 0,05$) y efecto significativo del tiempo ($F_{(9,324)} = 18,09$; $p < 0,0001$), pero no reportó interacción entre las variables estrés, tratamiento y tiempo (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino x tiempo: $F_{(9,324)} = 0,69$; $p > 0,05$).

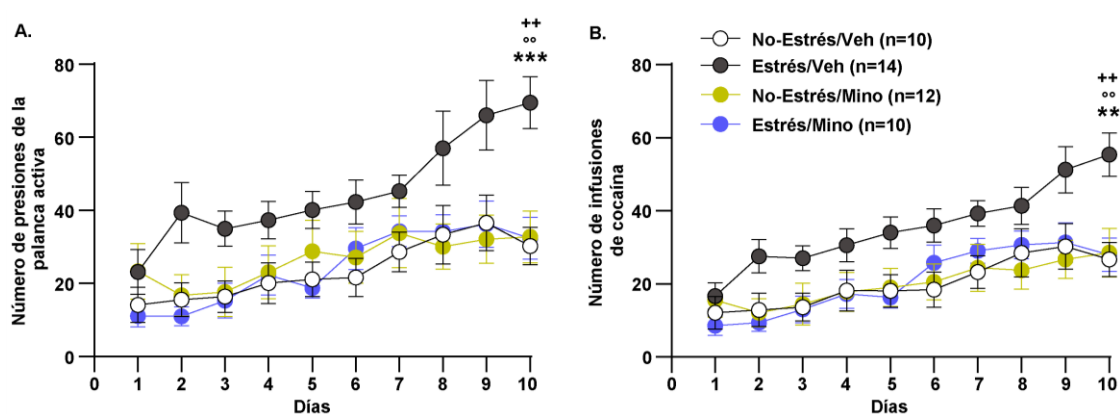


Figura 36. Autoadministración endovenosa de cocaína. A) Número de presiones de la palanca activa durante 10 días de registro conductual. B) Número de infusiones de cocaína durante 10 días de registro conductual. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

Para evaluar si había diferencia entre los grupos experimentales conforme transcurrían los días, se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos el último día del protocolo experimental mediante ANOVA de dos vías.

El análisis de los resultados correspondientes al número de presiones de la palanca activa (día 10) reveló interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,36)} = 8,74$; $p < 0,01$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,36)} = 8,35$; $p < 0,01$) y del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,36)} = 6,63$; $p < 0,05$). El *test* de comparaciones múltiples de Bonferroni demostró diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh ($***p < 0,001$), y entre los grupos Estrés/Veh y Estrés/Mino ($^{++}p < 0,01$).

El mismo análisis estadístico se realizó con los datos correspondientes a las infusiones de cocaína. El ANOVA de dos vías realizado a partir de los datos obtenidos el día 10 evidenció interacción significativa entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,36)} = 6,36$; $p < 0,05$), efecto significativo del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,36)} = 5,89$; $p < 0,05$) y del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,36)} = 4,83$; $p < 0,05$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni demostró diferencias significativas entre los grupos No-Estrés/Veh y Estrés/Veh ($**p < 0,01$), y entre los grupos Estrés/Veh y Estrés/Mino ($^{++}p < 0,01$).

Minociclina no manifestó efecto *per se* en relación al número de presiones de la palanca activa y el número de infusiones el día 10 del protocolo experimental (Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $^{\circ}p < 0,001$ y No-Estrés/Veh vs. No-Estrés/Mino: $p > 0,05$).

Estos resultados indicaron que el día 10, el número de presiones de palanca activa y de infusiones de cocaína se potenciaron significativamente en los animales sometidos previamente a estrés en comparación con los animales control. Interesantemente, minociclina fue capaz de revertir el efecto de facilitación del estrés sobre la adquisición de la conducta de autoadministración (figura 36A-B).

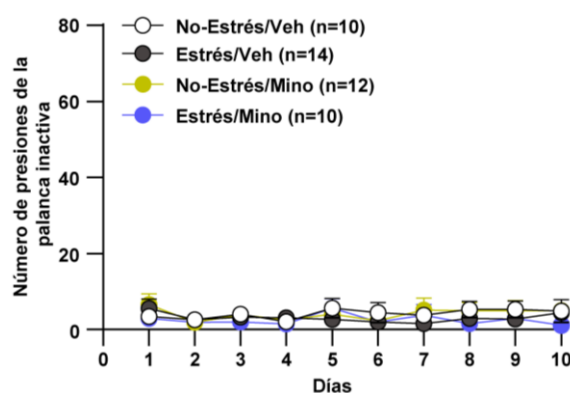


Figura 37. Autoadministración endovenosa de cocaína. Número de presiones de la palanca inactiva durante 10 días de registro conductual. Los datos se muestran como media \pm SEM. (Veh = vehículo, Mino = Minociclina).

Al evaluar las palancas inactivas (figura 37), el ANOVA de tres vías de muestras repetidas en función del tiempo no evidenció interacción entre las variables estrés, tratamiento y tiempo (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino x tiempo: $F_{(9,324)} = 1,00$; $p > 0,05$). Este análisis tampoco reveló interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,36)} = 0,07$; $p > 0,05$), ni efecto del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,36)} = 1,70$; $p > 0,05$), del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,36)} = 0,08$; $p > 0,05$) o del tiempo ($F_{(9,324)} = 1,35$; $p > 0,05$), lo que demuestra que los animales diferenciaron la palanca activa de la inactiva y la conducta fue dirigida al objetivo (búsqueda de la droga).

En la figura 38 se observa el desempeño durante el protocolo de autoadministración del animal con mejor rendimiento conductual de cada grupo experimental. Las imágenes de la columna A corresponden a los gráficos raster que representan la presión de la palanca activa (líneas azules) e inactiva (líneas rojas) durante los 120 min de sesión diaria en los 10 días de registro conductual.

Con el fin de inferir la concentración de cocaína que se alcanza en cerebro durante cada sesión de autoadministración, las infusiones de cocaína se convirtieron en concentraciones cerebrales de la droga utilizando el software Matlab (MathWorks) y una ecuación obtenida de un estudio farmacocinético (Pan y col., 1991). Estas concentraciones fueron representadas en gráficos en formato de mapas de colores que representan la concentración de cocaína cerebral durante los 120 min de sesión diaria en los 10 días de registro conductual (imágenes de la figura 38 columna C). La presión de la palanca activa y la conversión de las infusiones en concentración de cocaína en el cerebro evidencian la facilitación de la adquisición de la conducta de autoadministración. De manera interesante, los niveles de cocaína en el cerebro se observaron estables en el animal expuesto a estrés (Estrés/Veh), tal como se observa en la columna B de la figura 38 (día 5 y día 10), mientras que el animal control de mejor rendimiento (No-Estrés/Veh) no mostró estabilización de la concentración de cocaína en cerebro hasta el día 10 (figura 37, columna B).

Importantemente, el tratamiento con minociclina logró mitigar la facilitación de la adquisición de la autoadministración de cocaína potenciada por la exposición previa a estrés crónico (figura 36), efecto que también se observó en los gráficos raster y mapas de color (figura 38, columnas A y C).

En conjunto estos datos sugieren que la microglía participa en los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la facilitación de la adquisición de la autoadministración de cocaína inducida por la exposición a estrés crónico.

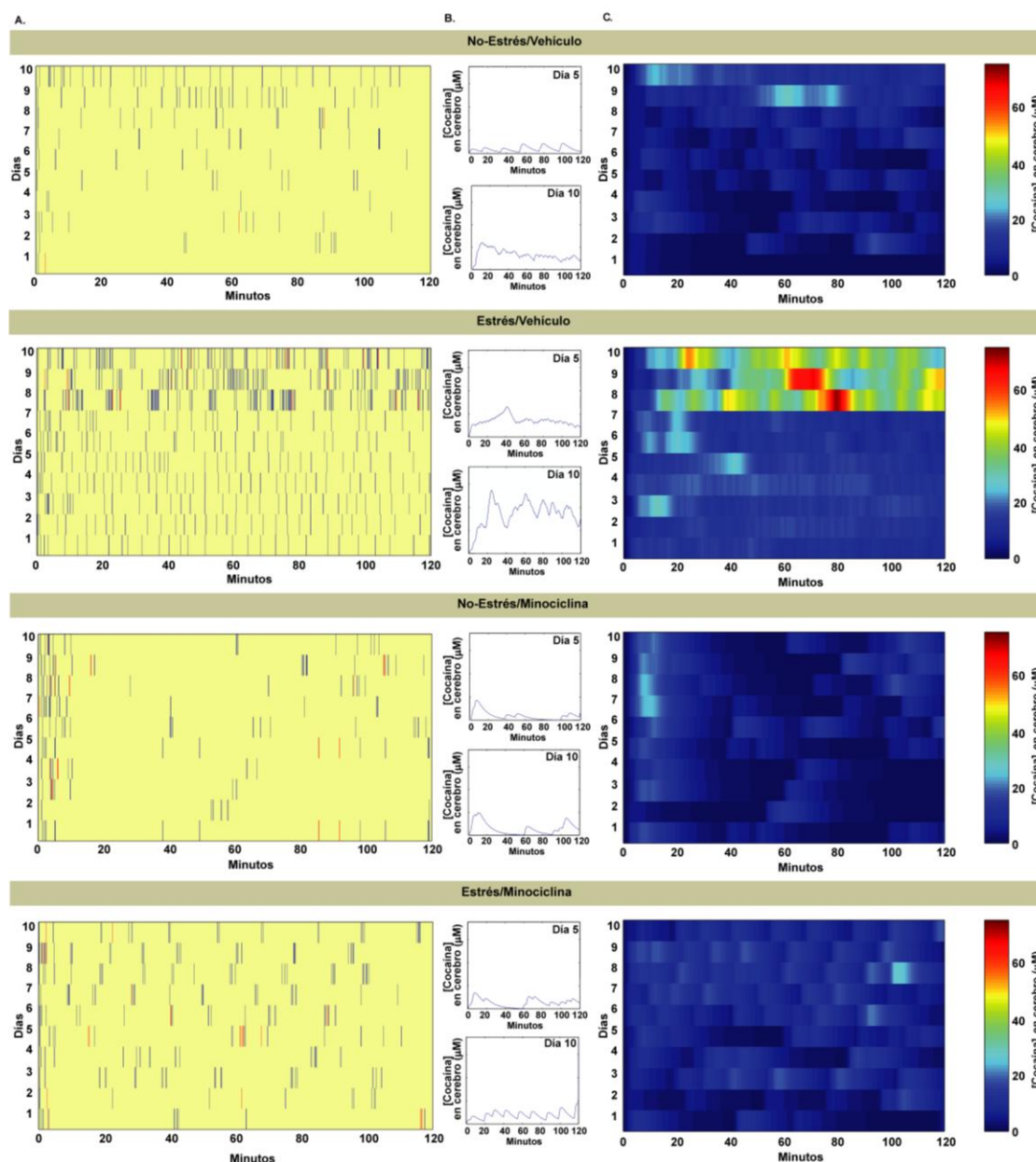


Figura 38. A) Gráficos raster de cada grupo experimental. Las líneas rojas representan la presión de la palanca inactiva, mientras que las azules representan la presión de la palanca activa. B) Concentración de cocaína en cerebro en función del tiempo de duración de la sesión de autoadministración de cocaína los días 5 y 10. C) Mapas de colores que representan la concentración de cocaína en cerebro durante los 120 min diarios de autoadministración en un protocolo de 10 días de registro conductual. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

Para evaluar la especificidad del tratamiento con minociclina sobre la influencia de la exposición a estrés crónico en la autoadministración de cocaína, evaluamos la ingesta de un reforzador natural (sacarosa) siguiendo el mismo protocolo experimental descrito, con la única diferencia que este grupo de animales fue sometido a un protocolo de autoadministración oral. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias entre los grupos experimentales (figuras 39 y 40).

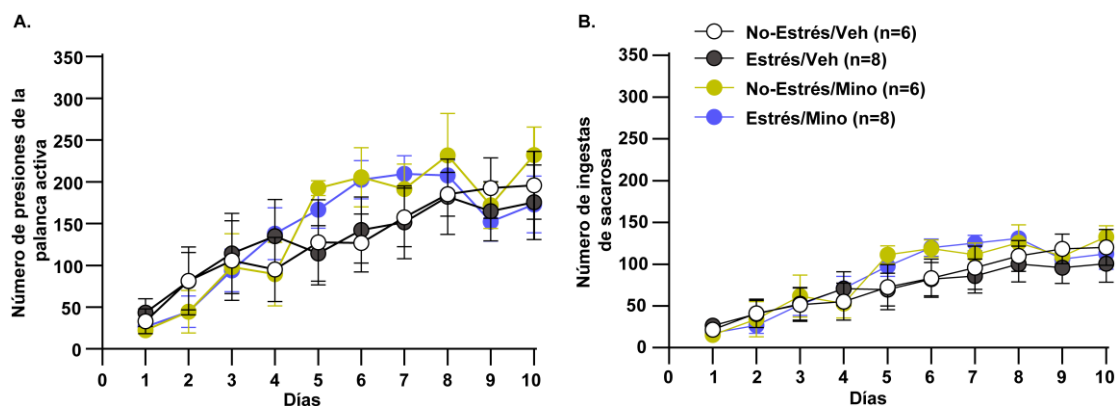


Figura 39. Autoadministración oral de sacarosa. A) Número de presiones de la palanca activa durante 10 días de registro conductual. B) Número de ingestas de sacarosa durante 10 días de registro conductual. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

El análisis de datos correspondientes al número de presiones de la palanca activa, mediante ANOVA de tres vías de muestras repetidas en función del tiempo, evidenció efecto del tiempo ($F_{(9,216)} = 21,73$; $p < 0,0001$). Sin embargo, este análisis no evidenció interacción entre las variables estrés, tratamiento y tiempo (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino x tiempo: $F_{(9,216)} = 0,13$; $p > 0,05$) o interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,24)} = 0,02$; $p > 0,05$). Tampoco se observó efecto del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,24)} = 0,02$; $p > 0,05$) o del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,24)} = 0,33$; $p > 0,05$). De manera similar, el análisis estadístico del consumo de sacarosa reveló efecto del tiempo ($F_{(9,216)} = 38,46$; $p < 0,0001$), pero no evidenció interacción entre las variables estrés, tratamiento y tiempo (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino x tiempo: $F_{(9,216)} = 0,30$; $p > 0,05$) o interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,24)} = 0,01$; $p > 0,05$). Por otro lado, tampoco se observó efecto del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,24)} = 0,05$; $p > 0,05$) o del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,24)} = 0,78$; $p > 0,05$).

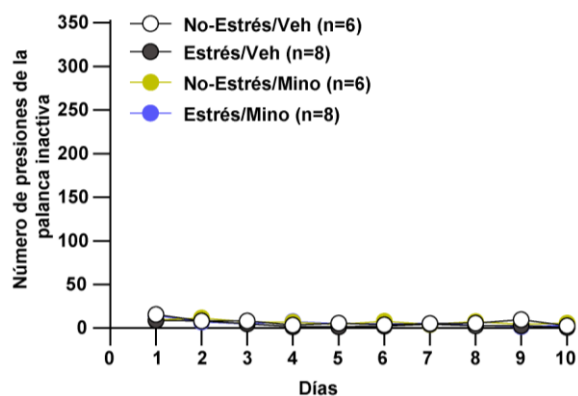


Figura 40. Autoadministración oral de sacarosa. Número de presiones de la palanca inactiva durante 10 días de registro conductual. Los datos se muestran como media \pm SEM. (Veh = vehículo, Mino = minociclina).

En cuanto al número de palancas inactivas, el análisis estadístico reveló efecto principal del tiempo ($F_{(9,216)} = 9,47$; $p < 0,0001$), pero no evidenció interacción entre las variables estrés, tratamiento y tiempo (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino x tiempo: $F_{(9,216)} = 1,73$; $p > 0,05$) o interacción entre las variables estrés y tratamiento (No-Estrés vs. Estrés x Veh vs. Mino: $F_{(1,24)} = 0,62$; $p > 0,05$). Además, tampoco se observó efecto del estrés (No-Estrés vs. Estrés: $F_{(1,24)} = 2,92$; $p > 0,05$) o del tratamiento (Veh vs. Mino: $F_{(1,24)} = 0,64$; $p > 0,05$). Es importante destacar que el análisis estadístico reveló que el tratamiento con minociclina no tuvo ningún efecto en la autoadministración de sacarosa entre los distintos grupos experimentales, lo que sugiere que minociclina no altera el consumo de un reforzador natural como sacarosa.

Conclusión Parcial: Estos resultados indican que la exposición a estrés facilita la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína, mientras que el tratamiento con minociclina es capaz de prevenir esta alteración conductual, efecto que puede ser atribuido a la restauración funcional de las células microgliales y consecuentemente al restablecimiento de la homeostasis glutamatérgica en NAc core. Importantemente, los resultados indican que el tratamiento con minociclina tiene especificidad sobre la influencia de estrés crónico en la autoadministración de cocaína ya que minociclina no modificó la ingesta de un reforzador natural como la sacarosa.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo demostramos la influencia facilitadora de la exposición a estrés crónico en el desarrollo del fenómeno de sensibilización conductual cruzada al efecto estimulante motor de cocaína y la adquisición de la conducta de autoadministración de esta droga. Este estudio aporta importantes evidencias sobre el efecto a largo plazo que ejerce la exposición a estrés crónico sobre la liberación de dopamina y glutamato inducida por cocaína, enfatizando la contribución diferencial de los compartimentos de NAc, core y shell, y la desregulación de mecanismos glutamatérgicos en NAc core, mediada por células gliales (astrocitos y microglía), que contribuyen a la vulnerabilidad a la adicción a cocaína.

En primer lugar, tres semanas después del primer episodio de estrés crónico, la administración no contingente de una dosis de cocaína (15 mg/Kg i.p.) puso en evidencia el fenómeno de sensibilización cruzada al efecto estimulante motor de cocaína y el fenómeno de sensibilización dopaminérgica en NAc core, pero no en shell, en los animales previamente estresados. Estos resultados nos permitieron validar el modelo de sensibilización.

Además, se observó una robusta atenuación de la liberación de glutamato en NAc core en respuesta a una inyección i.p. de cocaína dos semanas después del último episodio de estrés. Por el contrario, en NAc shell, si bien cocaína provocó la liberación de glutamato, no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. La alteración neuroquímica observada en el compartimento core de NAc fue asociada a una diferencia encontrada en los niveles de glutamato extracelular de la línea de base experimental. Efectivamente, estos resultados fueron corroborados mediante un experimento de microdiálisis *in vivo* por el método de *no net flux*, el cual evidenció un aumento de la concentración basal de glutamato extracelular. Este hallazgo fue atribuido a una reducida expresión del transportador de glutamato GLT-1. Consistentemente, se observó una alteración en la actividad astrogliar evidenciada por una disminución de la inmunoreactividad de GFAP. En conjunto, estos resultados indicaron una marcada desregulación de la homeostasis de glutamato en NAc core inducida por la exposición a estrés crónico. Consecuente a esta desregulación homeostática, se observó una importante y duradera remodelación estructural postsináptica en esta región cerebral. Estos cambios plásticos estructurales consistieron en un incremento en la densidad total de espinas dendríticas y de espinas tipo *mushroom* en los animales previamente estresados.

En segundo lugar, se observaron persistentes cambios morfológicos y funcionales en la microglía en NAc core tras la exposición a estrés crónico. Estas alteraciones se caracterizaron por un aumento de la complejidad y extensión de los procesos microgliales con un perfil característico de hiper-ramificación sin cambios en el número de ramificaciones primarias, un incremento de la inmunoreactividad de Iba-1, un aumento de los niveles de expresión de ARNm que codifica para TNF- α en paralelo a una marcada tendencia de aumento de ARNm que codifica para IL-1 β y un incremento del número de células Iba-1 positivas. Estos cambios

fueron asociados a la alteración, previamente descrita, de los mecanismos glutamatérgicos que subyacen la comorbilidad entre los trastornos de estrés y uso de sustancias psicoactivas ya que; al restablecer los niveles de glutamato basal a través de la normalización de la expresión de GLT-1 y de la actividad astrogliar, y restaurar los cambios plásticos estructurales postsinápticos mediante un tratamiento sistémico con minociclina, se suprimió la capacidad del estrés para facilitar la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína y potenciar la actividad psicomotora luego de una inyección no contingente de cocaína. Importantemente, este efecto preventivo de minociclina fue atribuido a su capacidad para restaurar la morfología y función de la microglía y su acción como inhibidor selectivo de la polarización microglial hacia el estado proinflamatorio.

En síntesis, los resultados obtenidos demostraron que la desregulación de los mecanismos glutamatérgicos en NAc core, que subyace a la potenciación de los efectos estimulante motor y reforzante de cocaína inducida por la exposición a estrés crónico, es un proceso dependiente de la participación de la microglía.

Potenciación de las propiedades estimulantes de cocaína sobre la actividad motora y liberación de dopamina en NAc core, pero no en shell, en un modelo de sensibilización cruzada inducida por estrés crónico.

El estudio de la sensibilización cruzada conductual y dopaminérgica a psicoestimulantes inducida por la pre-exposición a estrés en NAc ha sido llevado a cabo por numerosos laboratorios. Por un lado, se ha reportado la potenciación de la actividad locomotora y la liberación de dopamina inducidas por distintas drogas de abuso como cocaína (Brodnik y col., 2017; Kippin y col., 2008; Rouge-Pont y col., 1995; Sorg y Kalivas, 1991), anfetamina y morfina (Deroche y col., 1995) en NAc en animales previamente sometidos a diferentes tipos de estímulos estresantes como *shock* eléctrico en las patas (Sorg y Kalivas, 1991), restricción de comida (Deroche y col., 1995; Rouge-Pont y col., 1995), estrés prenatal inducido mediante estrés materno por restricción de movimiento (Kippin y col., 2008) y estrés inducido por exposición al olor de un predador (Brodnik y col., 2017). Sin embargo, estos estudios evalúan a NAc como una región homogénea, posiblemente enmascarando la contribución diferencial de cada uno de sus dos compartimentos a los cambios conductuales observados.

Por otro lado, los estudios dirigidos a evaluar el rol específico que juegan los compartimentos de NAc han evidenciado resultados divergentes en cuanto al rol predominante de NAc core o shell en la expresión a largo plazo de la sensibilización (García-Keller y col., 2013; Pacchioni y col., 2007; Boyson y col., 2011, 2014; Cadoni y Di Chiara, 1999; Cadoni y col., 2000; Giorgi y col., 2005; Pierce y Kalivas, 1995, 1997b).

Las evidencias aquí presentadas coinciden con hallazgos previos de nuestro laboratorio que asocian la sensibilización cruzada conductual a cocaína inducida por una única sesión de estrés con la sensibilización dopaminérgica, exclusivamente en NAc core, en respuesta a una dosis desafío de la droga 21 días después de la sesión de estrés (García-Keller y col., 2013). De modo similar, en un modelo de sensibilización cruzada entre estrés agudo y anfetamina, los cambios conductuales se relacionaron con una robusta liberación de dopamina producida por anfetamina, tanto en NAc core como en NAc shell, 24 h después de la sesión de estrés. Curiosamente, esta alteración neuroquímica persistió en NAc core incluso 8 días después de la única sesión de estrés, mientras que a este tiempo la respuesta en NAc shell se encontró atenuada (Pacchioni y col., 2007).

Los resultados obtenidos en esta tesis también son coherentes con aquellos que indican que el estrés puede activar el circuito dopaminérgico mesolímbico a través del receptor CRFR1, lo que contribuye al desarrollo de adaptaciones neurales duraderas que potencian los efectos reforzantes y estimulantes psicomotores de cocaína (Boyson y col., 2011). Otro estudio del mismo laboratorio centrado en el rol de CRFR1 y CRFR2 en ATV, empleando un protocolo de estrés intermitente por derrota social, reveló una marcada sensibilización dopaminérgica en NAc shell en paralelo a la expresión de sensibilización conductual cruzada a cocaína en animales previamente estresados, las cuales fueron puestas en evidencia 10 días después de la última exposición a estrés (Boyson y col., 2014). Aunque es claro que esta investigación se centró en el estudio de la proyección dopaminérgica desde ATV hacia NAc shell, no se evaluaron los niveles de dopamina en NAc core, una región clave que participa en la expresión del fenómeno de sensibilización.

En cuanto a la sensibilización conductual inducida por la exposición repetida a drogas de abuso, en modelos animales de sensibilización a morfina, cocaína y anfetamina, este fenómeno se relacionó con una mayor estimulación de la transmisión dopaminérgica en NAc core, pero no en shell, en respuesta a una dosis desafío de estas drogas después de un período de abstinencia de entre 10 y 15 días (Cadoni y Di Chiara, 1999; Cadoni y col., 2000; Giorgi y col., 2005). Incluso se ha asociado la expresión de la sensibilización a anfetamina al reclutamiento de una población de neuronas reactivas en NAc core, pero no en shell, dos semanas después de un pre-tratamiento con anfetamina (Nordquist y col., 2008).

Por otro lado, aunque estudios diseñados para evaluar el componente presináptico del fenómeno de sensibilización han reportado sensibilización cruzada conductual y dopaminérgica en respuesta a anfetamina en animales expuestos previamente a un esquema de administración sistémica de cocaína, estos fenómenos fueron evidenciados estrictamente en animales sometidos a abstinencia a largo plazo cuando se monitoreó la conducta y los niveles de dopamina después de la microinyección de anfetamina en NAc shell, mientras que no fueron observados cuando se

realizó la administración en NAc core (Pierce y Kalivas, 1995). Es sumamente importante destacar que este estudio fue realizado mediante la infusión local de la droga en el área cerebral de interés. En este contexto, los efectos de la anfetamina sobre la liberación de dopamina y la actividad motora fueron mediados por acciones circunscriptas a cada compartimento de NAc, con la contribución insignificante de ciertos mecanismos que comprenden la participación de importantes sistemas de neurotransmisión y regiones cerebrales que subyacen al fenómeno de sensibilización y que están particularmente involucrados en la administración sistémica de la droga.

En conjunto, estas evidencias sugieren que los mecanismos dopaminérgicos en core y shell contribuyen de manera diferente al fenómeno de sensibilización. El incremento de dopamina en NAc core parece ser la característica general de la expresión duradera de la sensibilización conductual a psicoestimulantes inducida por drogas de abuso y estrés. En cuanto al proceso adictivo y en apoyo a estas evidencias, se cree que NAc shell tendría un rol preponderante durante los primeros contactos con la droga, es decir en etapas tempranas del desarrollo de la adicción, mientras que NAc core mediaría la ejecución a largo plazo de las conductas relacionadas con la adicción (Di Chiara, 2002; Ito y col., 2004; Meredith y col., 2008).

Interesantemente, evidencias previas de nuestro laboratorio han reportado que la sensibilización dopaminérgica en NAc core asociada a la sensibilización conductual observada tras la administración no contingente de una dosis desafío de anfetamina en animales previamente expuestos a estrés, es un evento neuroquímico dependiente de glutamato; dado que la administración de MK-801, un antagonista de los receptores glutamatérgicos NMDA, 30 min antes de la exposición a estrés agudo por restricción de movimiento fue capaz de bloquear la sensibilización dopaminérgica y conductual (Pacchioni y col., 2007). Estudios posteriores enfocados en la interacción de la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica en NAc core demostraron que el bloqueo de los receptores glutamatérgicos AMPA, mediante la administración del antagonista CNQX, fue capaz de prevenir la sensibilización dopaminérgica y conductual en respuesta a cocaína observada a largo plazo en animales pre-estresados (García-Keller y col., 2013). De este modo, las alteraciones inducidas por estrés en las transmisiones dopaminérgicas y glutamatérgicas que convergen en NAc core serían las responsables de generar los cambios bioquímicos persistentes que subyacen al fenómeno de sensibilización conductual cruzada a psicoestimulantes (García-Keller y col., 2013; Pacchioni y col., 2007), lo cual también denota que ambos sistemas de neurotransmisión constituyen sustratos neurobiológicos comunes al impacto del estrés y las drogas de abuso.

Relevancia de la desregulación de la homeostasis de glutamato en NAc core, pero no en shell, para la vulnerabilidad al desarrollo de abuso de cocaína luego de la exposición crónica a estrés.

La alteración de la homeostasis de glutamato, observada 21 días después de la primera sesión de estrés crónico, se evidenció como una atenuada liberación de glutamato inducida por cocaína. Este hallazgo fue atribuido a una marcada tendencia de aumento de los niveles basales de glutamato observada en NAc core, pero no en shell, cuando se compararon los valores absolutos de la línea de base de ambas regiones cerebrales entre los animales previamente estresados y los controles en el experimento conducido a evaluar la capacidad de cocaína para liberar glutamato. Efectivamente, esta tendencia observada fue confirmada luego utilizando el método de *no net flux* para el monitoreo de los niveles basales de glutamato extracelular. A su vez, el incremento de la concentración basal de glutamato extracelular fue atribuido a la disminución de la expresión de GLT-1 en NAc core. Todos estos resultados demuestran ser altamente consistentes entre ellos y se correlacionan con hallazgos previos de nuestro laboratorio realizados en un modelo de sensibilización cruzada a cocaína inducida por una única sesión de estrés (García-Keller y col., 2013, 2016).

Curiosamente, se observó un aumento de la liberación de glutamato tras la administración i.p. de cocaína en animales no estresados, lo que constituye un resultado interesante a discutir. Numerosos estudios centrados en el desarrollo de sensibilización a cocaína sugieren que es necesario un periodo de abstinencia prolongado para observar cambios neuroplásticos en la transmisión glutamatérgica en NAc y VTA (Kalivas y Duffy, 1998; Pierce y col., 1996; Reid y Berger, 1996). Estos hallazgos coinciden en gran medida con nuestros resultados observados a largo plazo en animales expuestos a estrés. Sin embargo, no explican el aumento de glutamato extracelular observado en los animales control luego de la administración i.p. de cocaína. Diversos estudios han reportado un aumento de la liberación de glutamato provocado por cocaína en NAc core en animales que expresaron sensibilización conductual a cocaína, pero no en aquellos que fueron tratados con solución salina o no evidenciaron sensibilización a cocaína tras 21 días de abstinencia (Pierce y col., 1996). Resultados similares en animales sensibilizados fueron demostrados tras 10 días de abstinencia a cocaína (Reid y Berger, 1996). También, estudios en VTA mostraron que la administración de una dosis desafío de cocaína después de 21 días de abstinencia aumentaba la liberación de glutamato de forma selectiva en los animales sensibilizados a cocaína (Kalivas y Duffy, 1998).

En contraste con estos datos, pero en consistencia con nuestros resultados, se reportó que independientemente del desarrollo de sensibilización a anfetamina o de un tratamiento con solución vehículo, una dosis alta de anfetamina es capaz de inducir un aumento retardado de la

liberación de glutamato en NAc y VTA (Xue y col., 1996). Por otro lado, se ha sugerido que se requieren dosis elevadas de cocaína, aparentemente superiores a 15 mg/Kg, para observar un aumento de la liberación de glutamato en animales control (Smith y col., 1995; Torregrossa y Kalivas, 2008). En cuanto a los hallazgos de nuestro laboratorio, los resultados aquí mostrados son altamente reproducibles con nuestros datos publicados previamente, en los que la inyección i.p. de una dosis aguda de cocaína evocó una mayor liberación de glutamato en NAc core en animales que no habían sido sometidos a estrés (García-Keller y col., 2013). Por lo tanto, el hecho de que una única dosis sistémica de cocaína (15 mg/Kg) pueda inducir un marcado aumento del glutamato extracelular probablemente sea el resultado de un efecto sinérgico de la inyección del psicoestimulante y de la acumulación de glutamato extracelular debido al daño tisular ocasionado tras la implantación de la sonda de diálisis descrito por Xue y col., (1996).

Múltiples líneas de investigación reportaron que la concentración basal extrasináptica de glutamato extracelular regula la actividad sináptica glutamatérgica actuando sobre los autoreceptores metabotrópicos presinápticos mGluR2/3, que ejercen un tono inhibitorio sobre la liberación de glutamato (Baker y col., 2002; Pendyam y col., 2009). En este contexto, el aumento persistente de los niveles basales de glutamato extracelular observado en nuestro estudio, podría contribuir a un aumento del tono inhibitorio de los receptores mGluR2/3 modulando los niveles de glutamato extracelular de origen sináptico en respuesta a un estímulo capaz de favorecer la liberación sináptica de glutamato. Esta hipótesis explicaría la atenuada liberación de glutamato observada en NAc core, en respuesta a la administración no contingente de cocaína, en animales previamente estresados.

En contraste a las alteraciones en la homeostasis de glutamato inducidas por estrés descritas anteriormente, la discontinuación de la administración crónica de cocaína fue capaz de disminuir los niveles basales de glutamato extracelular en NAc core (Baker y col., 2003) mientras que, en respuesta a un estímulo de cocaína, los niveles extracelulares de glutamato incrementaron notablemente (Pierce y col., 1996; Reid y Berger, 1996). Los mecanismos postulados que sustentan estos hallazgos involucran el intercambio reducido de cistina-glutamato a través del sistema Xc⁻ (Baker y col., 2003; Knackstedt y col., 2010; Trantham-Davidson y col., 2012) y la reducción del transporte de glutamato mediado por GLT-1 en NAc core (Knackstedt y col., 2010; Trantham-Davidson y col., 2012). Por otra parte, se ha reportado que la mayor parte del glutamato extraído por microdiálisis deriva de una fuente no neuronal (Baker y col., 2002; Moussawi y col, 2011). Así pues, se demostró que la contribución glial al monitoreo de neurotransmisores por microdiálisis supera el aporte sináptico y tanto el intercambio de cistina-glutamato como la recaptación de glutamato mediante transportadores desempeñan un rol dominante (Moussawi y col, 2011; Pow, 2001; Sato y col, 2002).

El intercambiador Cis-Glu funciona típicamente liberando glutamato no vesicular al espacio extracelular, lo que nos motiva a pensar que la alteración observada en nuestro estudio sea independiente de este mecanismo. Así, el aumento persistente de los niveles de glutamato extracelular observados 21 días después de la primera exposición a estrés, no dependería de alteraciones en el mecanismo de Xc^- sino que sería dependiente de la expresión reducida de GLT-1. Esta hipótesis está respaldada por un estudio previo de nuestro laboratorio enfocado en la evaluación del mecanismo de captación de glutamato- H^3 independiente de Na^+ , el cual demostró que la exposición a una sola sesión de estrés por restricción de movimiento no afecta la actividad del intercambiador Cis-Glu (García-Keller y col., 2016). Por lo tanto, de manera similar al estrés agudo, el incremento de la concentración de glutamato extracelular inducido por estrés crónico fue atribuido a la reducida expresión de GLT-1 observada en NAc core. Por consiguiente, se esperaría una reducción de la captación de glutamato extracelular a expensas de la disminuida expresión de este transportador.

Diversos estudios han relacionado la pendiente del gráfico de regresión lineal del experimento de *no net flux* con el mecanismo de recaptación de neurotransmisores. Aunque se han descubierto alteraciones en la expresión de GLT-1 en paralelo con cambios en la pendiente de la curva de *no net flux* (Das y col., 2015; Trantham-Davidson y col., 2012), los resultados aquí obtenidos no apoyan esta relación. Evidencias prueban que la diferencia entre las pendientes refleja un cambio en la fracción de extracción (E_d) de la sonda (*probe*) de microdiálisis. Se ha demostrado empíricamente que este parámetro, es decir E_d , es una medida de la recaptación de neurotransmisores como dopamina y acetilcolina (Bungay y col., 2003; Smith y Justice, 1994; Vinson y Justice, 1997). Dado que las concentraciones de glutamato están reguladas por múltiples mecanismos complejos que involucran la acción de receptores, transportadores e intercambiadores, una relación directa entre la pendiente y la E_d como índice preciso de estimación de la recaptación puede no ser el caso del glutamato (Bungay y col., 2003; Chen, 2006; Pendyam y col., 2009).

En consistencia con nuestros resultados, la disminución de la expresión y/o función de GLT-1 en regiones que comprenden el circuito de la motivación ha sido reportada en respuesta a distintos tipos de estímulos estresantes y drogas de abuso. Estudios han revelado una reducción significativa de GLT-1 en hipocampo y corteza cerebral, cinco semanas después de la exposición a estrés por *shock* eléctrico (Zink y col., 2010). Una reducción del mecanismo de recaptación de glutamato- H^3 dependiente de Na^+ en rebanadas cerebrales corticales, estriatales e hipocampales de animales pre-expuestos a estrés inescapable por *shock* eléctrico fue observada 21 días después de la exposición a estrés (Almeida y col., 2010). De manera similar, este mecanismo se encontró reducido en NAc core 21 días después de la exposición a una sesión de estrés por restricción de movimiento (García-Keller y col., 2016). Además, estudios sobre

trastornos psiquiátricos inducidos por estrés revelaron una reducción persistente de GLT-1 en regiones estriatales y prefrontales en animales pre-expuestos a estrés crónico por derrota social (Rappeneau y col., 2016). Estos hallazgos coinciden con la disminución de la expresión y/o función de GLT-1 reportada tras la discontinuación de la ingesta voluntaria crónica de etanol y la autoadministración de diferentes tipos de drogas de abuso, tales como cocaína, heroína o nicotina, y la consecuente alteración de la homeostasis del glutamato en NAc preferentemente core (Das y col., 2015; Gipson y col., 2013; Knackstedt y col., 2010; Melendez y col., 2005; Reissner y col., 2015; Sari y Sreemantula, 2012; Shen y col., 2014; Trantham-Davidson y col., 2012). Otro reporte enfocado en el estudio del efecto diferencial del tiempo de acceso y abstinencia de cocaína demostró que, mientras la expresión de GLT-1 se reduce después de la autoadministración de cocaína en ambos compartimentos de NAc, la abstinencia prolongada de cocaína provoca una disminución aún mayor de la expresión de este transportador, siendo en NAc core, el cambio más prominente en animales sometidos tanto a un esquema de acceso limitado o extendido a la droga (Fischer-Smith y col., 2012). Así, la disminución de la recaptación de glutamato en NAc core, un mecanismo conservado tras la exposición a múltiples clases de drogas adictivas, apunta a una disfunción de los mecanismos glutamatérgicos que contribuyen a los incrementados niveles de glutamato observados en el NAc core durante la reinstalación de la conducta de búsqueda de drogas (Kalivas, 2009).

Interesantemente, el restablecimiento de GLT-1, pero no del intercambiador Cis-Glu, mediante el tratamiento con NAC (Reissner y col., 2015), así como la restauración de los niveles de expresión de GLT-1 inducido por ceftriaxona (Sari y col., 2009), parecería ser el mecanismo clave mediante el cual NAC y ceftriaxona suprimirían la reinstalación de la conducta de búsqueda de cocaína inducida por claves previamente apareadas a la droga. Más interesante aún es el hecho que ceftriaxona, al restaurar la expresión de GLT-1 en NAc core, fue capaz de revertir la potenciación de los efectos estimulante motor y reforzante de cocaína inducida por estrés agudo (García-Keller y col., 2016). Todos estos datos proporcionan sustancial evidencia de que: 1) la disminución de la expresión y/o función de GLT-1 en NAc core es una adaptación compartida, observada en respuesta a la exposición a estrés y a una amplia variedad de drogas adictivas; y 2) los efectos duraderos de ambos estímulos sobre la expresión y/o función de este transportador están asociados a alteraciones conductuales.

Consistentemente, en este estudio demostramos que minociclina, un inhibidor de la activación de la microglía (Tikka y col., 2001) normalizó las concentraciones basales de glutamato extracelular en NAc core en animales pre-estresados mediante la restauración de la expresión de GLT-1, restableciendo así la homeostasis de glutamato en NAc core. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la normalización de la concentración basal de glutamato puede restablecer el tono del mGluR2/3 presináptico, regulando de este modo la liberación

sináptica de glutamato después de un estímulo motivacionalmente importante como la inyección de cocaína, y previniendo, consecuentemente, la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés. Esta hipótesis constituye un mecanismo clave que concuerda con el propuesto por trabajos enfocados en el estudio de la homeostasis de glutamato tras la autoadministración crónica de cocaína (Knackstedt y col., 2010; Moran y col., 2005; Trantham-Davidson y col., 2012). Finalmente, el efecto observado de minociclina, ligado a su capacidad terapéutica como restaurador de la función microglial, demuestra que la microglía es un actor clave en la regulación de la homeostasis glutamatérgica.

Contribución de la microglía y los astrocitos a la desregulación de la homeostasis de glutamato inducida por estrés crónico en NAc core.

Múltiples líneas de investigación han centrado sus estudios en las alteraciones morfológicas y funcionales de la microglía. En consistencia con nuestros resultados, evidencias recientes señalan que un protocolo de 6 días de estrés crónico por *shock* eléctrico fue capaz de promover cambios conductuales vinculados al trastorno de estrés postraumático, la activación de la microglía en CPf e hipocampo y un incremento duradero de citoquinas proinflamatorias (entre ellas TNF- α e IL-1 β). Estas alteraciones fueron observadas nueve días después del último episodio de estrés. Interesantemente, un tratamiento intragástrico de seis días con minociclina, administrado 30 minutos antes de cada sesión de estrés, fue capaz de prevenir estos cambios conductuales y moleculares, evento que fue asociado al efecto anti-inflamatorio del antibiótico (Wang y col., 2018). Consistentemente, en nuestro estudio evidenciamos un incremento de los niveles de ARNm que codifican para TNF- α en NAc core. Sin embargo, no observamos un aumento estadísticamente significativo de los niveles de ARNm que codifican para IL-1 β en esta región cerebral. Esta discrepancia observada en comparación con el estudio de Wang y col., (2018) probablemente se deba a la existencia de respuestas neuroinmunes diferentes entre diversas regiones cerebrales, al empleo de distintos protocolos para inducir estrés y/o al tiempo de medición.

Por otro lado, en apoyo a los resultados presentados en esta tesis, numerosas líneas de investigación han reportado que diversos protocolos de estrés crónico son capaces de inducir tanto la hiper-ramificación de los procesos microgliales, evidenciada por un incremento de las ramificaciones secundarias sin alteración en el número de ramificaciones primarias (Hinwood y col., 2012b), como cambios en la expresión de Iba-1 en distintas regiones cerebrales que comprenden el circuito de la motivación (Tynan y col., 2010, Hinwood y col., 2012a; Wang y col., 2018; Wohleb y col., 2011). Aunque se dispone de poca información sobre el rol que ejercen los cambios morfológicos y funcionales de estas células asociados a un estado de hiper-

ramificación, parece ser que este perfil microglial es un estado intermedio entre el estado de reposo y el estado activo, que señala el comienzo de la hipertrofia microglial, una característica morfológica constante de la activación microglial *in vivo*. Este estado microglial ha sido atribuido a cambios homeostáticos de naturaleza sutil (Streit y col., 1999) y a estímulos no patológicos dependientes de la experiencia (Fontainhas y col., 2011; Hinwood y col., 2012a,b; Tremblay y col., 2010).

En cuanto a las consecuencias funcionales inducidas por la exposición a drogas adictivas, estas pueden alterar profundamente la función microglial y la liberación de mediadores inflamatorios, aunque se ha reportado que las respuestas dependen del tipo de droga, la dosis y la región cerebral (Coller y Hutchinson, 2012). Se ha demostrado que la administración de cocaína aguda produce un aumento del ARNm que codifica para IL-1 β en ATV (Northcutt y col., 2015), NAc y corteza cerebral (Cearley y col., 2011), mientras que metanfetamina produce un aumento de IL-6 y TNF- α en hipocampo y CPf (Gonçalves y col., 2008). En el mismo sentido, estudios *in vitro* demostraron que los cultivos de microglía al ser expuestos a cocaína aumentaban la transcripción de TNF- α , IL-6 (Liao y col., 2016) e IL-1 β (Northcutt y col., 2015). Otros estudios *in vivo* indicaron que la exposición a etanol parece sensibilizar la microglía, induciendo un estado de activación hiper-ramificado caracterizado por cambios morfológicos modestos y una mayor liberación de citoquinas proinflamatorias (Crews y col., 2017). Estas alteraciones en la respuesta inmune frente a distintas drogas de abuso se correlacionan con estudios que indicaron que la administración de cocaína y metanfetamina provoca un aumento de Iba-1 en numerosas regiones cerebrales, incluido el estriado (Liao y col., 2016). Más aún, recientemente se ha demostrado un aumento duradero de TNF- α en NAc core tras la autoadministración de nicotina seguida de un protocolo de extinción conductual (Namba y col., 2019), un hallazgo que se correlaciona notablemente con nuestros resultados.

En conjunto, todas estas evidencias demuestran que la alteración morfológica y funcional de la microglía, al igual que la alteración de GLT-1 mencionada anteriormente, es un evento compartido en respuesta a la exposición a eventos estresantes y a drogas de abuso.

Por otro lado, el incremento del número de células Iba-1 positivas observado en el presente estudio se correlaciona con el reporte de otros laboratorios. Se ha demostrado que la exposición a estrés por *shock* eléctrico induce incremento en el número de células Iba-1 positivas en CPf e hipocampo. Sin embargo, de modo similar a nuestros resultados observados en NAc core, el efecto restaurador de minociclina sobre el aumento de células Iba-1 positivas se evidenció en CPf, pero no en la región CA3 del hipocampo (Wang y col., 2018). De manera complementaria a este estudio, otros autores reportaron el reclutamiento de monocitos periféricos a estas regiones cerebrales tras la exposición a estrés por derrota social (Wohleb y col., 2013). Consistentemente, la considerable redistribución de monocitos periféricos

acompañada de un incremento en el tráfico de estas células hacia el cerebro, ha sido relacionada a perturbaciones en la función neuroinmune desencadenada tras la exposición repetida a estrés, evento que tiene una implicancia directa en la plasticidad sináptica y favorece el desarrollo de alteraciones conductuales relacionadas a trastornos de estrés (Wohleb y Delpech, 2017). Otro estudio mediante la cuantificación de células microgliales de cerebro total de ratones sometidos a estrés por restricción de movimiento, empleando citometría de flujo para el análisis de la expresión de los marcadores CD11b/CD45, indicó que durante el protocolo de estrés se observó proliferación de la microglía. Este evento fue atribuido a la activación de los receptores glutamatérgicos NMDA inducida por corticosterona en el SNC, ya que el bloqueo de la síntesis de corticosterona, de los receptores de glucocorticoides o los receptores NMDA mitigaron el aumento del número de células microgliales inducido por estrés. Interesantemente, la administración de MK-801, un antagonista de los receptores NMDA, bloqueó el incremento de estas células tras la administración de corticosterona exógena a ratones no estresados (Nair y Bonneau, 2006). Siguiendo la hipótesis de mecanismos comunes entre drogas de abuso y estrés, estas evidencias son coherentes con resultados previos de nuestro laboratorio, los cuales reportaron que la sensibilización a nivel inmune inducida por anfetamina, de manera paralela a lo que ocurre en el sistema límbico, fue bloqueada por un tratamiento sistémico con MK-801, por lo que se propuso que ambos fenómenos estarían mediados por un mecanismo dependiente de glutamato (Assis y col., 2009). Los resultados presentados en esta tesis se alinean con todos estos antecedentes. Curiosamente, minociclina no restauró el número de células Iba-1 positivas alterado tras la exposición a estrés. Sin embargo, dada la falta de especificidad del mecanismo de acción de minociclina, la vía de administración empleada para el tratamiento y que la distinción precisa entre la microglía y los macrófagos infiltrados desde la periferia, particularmente en tejidos, puede verse obstaculizada por la expresión compartida de marcadores tal como Iba-1 (Jurga y col., 2020; Kettenmann y col., 2011); en nuestro estudio no podemos establecer conclusiones acerca de la contribución del sistema inmune periférico o la existencia de otro mecanismo que esté contribuyendo a estas observaciones. Por lo tanto, este hallazgo y las evidencias que lo soportan plantean un interesante interrogante para futuros estudios en relación a la intercomunicación entre el sistema inmune cerebral y periférico tras la exposición repetida a estrés y su potencial impacto en el desarrollo de conductas adictivas.

Una de las principales características de las células microgliales es su alta sensibilidad para detectar alteraciones menores en el microambiente tisular, una capacidad que les permite desencadenar una rápida respuesta con el fin de regular y mantener la homeostasis tisular y contribuir al buen funcionamiento de las neuronas y otras células gliales (Kreutzberg, 1996). La participación de la microglía en la regulación de los mecanismos glutamatérgicos radica, en parte, en que estas células gliales expresan en su membrana plasmática receptores

glutamatérgicos (Murugan y col., 2013; Liu y col., 2016). Así, aunque no podemos excluir la participación simultánea de otros eventos moleculares (Frank y col., 2011, 2012), la presencia de estos receptores específicos le otorga respuesta selectiva frente a alteraciones en la homeostasis de glutamato. Además, dado que el glutamato es considerado una señal de alarma crítica para la microglía (Mayhew y col., 2015) y que estas células poseen la particularidad de activarse inmediatamente al detectar cambios en su entorno (Kreutzberg, 1996), es lógico pensar que, posiblemente y en parte, los cambios morfológicos y funcionales persistentes observados en estas células estén mediados inicialmente por el característico incremento de glutamato extracelular liberado en respuesta a estímulos estresantes (Moghaddam, 1993; Moghaddam y col., 1994; Popoli y col., 2012) y se mantengan en el tiempo producto de la desregulación de la homeostasis de glutamato inducida por estrés. Esta hipótesis se sustenta en dos evidencias. Por un lado, se ha demostrado una extensión de los procesos microgliales dependiente de glutamato (Eyo y col., 2014) y un perfil de hiper-ramificación de la microglía caracterizado por el aumento de la ramificación y la longitud de sus procesos en respuesta a glutamato o agonistas de los receptores AMPA o NMDA (Fontainhas y col., 2011), resultados que son consistentes con nuestros hallazgos. Por otro lado, se ha reportado que la activación de los receptores NMDA y la subsiguiente proliferación de la microglía *in vivo* es un evento que se desencadena posteriormente al incremento de los niveles de corticosterona en el SNC inducido por la exposición a estrés por restricción de movimiento (Nair y Bonneau, 2006). En base a estos resultados, se ha propuesto que la activación de los receptores NMDA inducida por glucocorticoides, liberados tras eventos estresantes, sería el resultado de la acumulación de glutamato extracelular, lo cual podría ocurrir por dos razones: un aumento de la actividad neuronal glutamatérgica (Moghaddam, 1993) o la disminución de la recaptación de glutamato (Virgin y col., 1991), mecanismos que encontramos alterados en nuestro estudio dos semanas luego de la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han reportado que la activación microglial por estimulación de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos e ionotrópicos puede desencadenar la liberación de TNF- α (Chaparro-Huerta y col., 2002; De y col., 2005; Noda y col., 2000; Taylor y col., 2005; Zhao y col., 2004; Zhu y col., 2010), lo que sugiere que el glutamato es capaz de desplazar la respuesta glial hacia un perfil proinflamatorio, un efecto que se alinea con los resultados observados en nuestro estudio. En apoyo a estas evidencias, el aumento de TNF- α en la corteza cerebral inducido por estrés de inmovilización parecería estar mediado por glutamato, ya que este incremento fue atenuado al administrar MK-801 (Madrigal y col., 2002).

Aunque se ha reportado que los astrocitos también pueden expresar y liberar TNF- α (Lau y Yu, 2001), el análisis del transcriptoma de estas células purificadas no reveló la presencia de transcritos que codifiquen para TNF- α (Cahoy y col., 2008; Doyle y col., 2008;

Foo y col., 2011; Meissner y col., 2008; Sharma y col., 2007; Zamanian y col., 2012). Independientemente de estas evidencias, dado que la microglía constituye el sistema inmune innato del cerebro, es difícil discutir que estas células no sean la principal fuente de citoquinas, particularmente de TNF- α .

Se ha demostrado que los mediadores inflamatorios inducidos tras la exposición a estrés o drogas de abuso contribuyen al mantenimiento de la desregulación de la homeostasis glutamatérgica por su acción a nivel postsináptico y a nivel glial (Clark y col., 2015; Lewitus y col., 2016; Mayhew y col., 2015; Namba y col., 2019; Wohleb y col., 2018). En este sentido, numerosos trabajos han demostrado una estrecha relación entre los niveles de citoquinas proinflamatorias, TNF- α e IL-1 β , y el transporte de glutamato (Tilleux y Hermans, 2007). Específicamente, estudios *in vitro* han descrito que TNF- α actúa de manera directa sobre los astrocitos reduciendo la expresión y función de GLT-1 (Carmen y col., 2009; Fine y col., 1996; Wang y col., 2003) por bloqueo de la transcripción vía NF κ B (Tolosa y col., 2011; Su y col., 2003; Sitcheran y col., 2005; Zou y Crews, 2005). Por otro lado, estudios emergentes realizados en animales expuestos a tratamientos farmacológicos con minociclina o naloxona y en animales que carecen del gen que codifica para IL-1 β (KO IL-1 β -/-) han sugerido que la reducción de la expresión de GLT-1 estaría también mediada por IL-1 β y aparentemente sería un proceso independiente de GFAP (Prow e Irani, 2008). Sin embargo, el mecanismo aún no es claro y no se conoce si IL-1 β actúa a nivel de transcripción, traducción, postraducción, tráfico a membrana o internalización del transportador. En nuestro caso, la disminuida expresión de GLT-1 podría ser atribuida al incremento significativo de la expresión génica de TNF- α observado, aunque no es posible aún descartar una influencia de IL-1 β dada la marcada tendencia observada en NAc core.

Por otro lado, si bien GLT-1 se expresa principalmente en los astrocitos, los cuales se encargan de la recaptación del 90-94% del glutamato extracelular (Lehre y col., 1995; Danbolt, 2001; Danbolt y col., 2016), en nuestro estudio no podemos excluir la contribución de GLT-1 de expresión neuronal (Rimmele y Rosenberg, 2016) y microglial (Kettenmann y col., 2011). Estudios de hibridación *in situ* demostraron la presencia de ARNm que codifica para GLT-1 en varias poblaciones neuronales (Berger y Hediger, 1998, 2000, 2001), aunque a niveles considerablemente más bajos que en los astrocitos. Estudios realizados en animales con delección condicional de GLT-1 astrocítico o neuronal revelaron el predominio cuantitativo de GLT-1 astrocítico tanto a nivel proteico como a nivel funcional (Petr y col., 2015; Danbolt y col., 2016). Otros estudios han demostrado que la contribución de la microglía a la recaptación de glutamato es de tan sólo un 10% en comparación con la actividad de GLT-1 en astrocitos (Persson y col. 2005; Shaked y col. 2005). Más aún, se ha reportado que la expresión de GLT-1 en células microgliales se observa predominantemente en condiciones neuropatológicas,

situaciones donde actuaría como respaldo funcional. Además, se ha sugerido que la microglía ejerce una función neuroprotectora por contribuir a la captación de glutamato extracelular y evitar la neurotoxicidad inducida por elevados niveles de glutamato en patologías en las que los astrocitos muestran una alteración funcional (Persson y col., 2005, 2012). En contraste, se ha reportado que en modelos de excitotoxicidad, a pesar de expresar transportadores de glutamato, la microglía no ha sido capaz de impedir la neurotoxicidad por recaptación de glutamato extracelular a través de los EAAT como lo hicieron los astrocitos (Liang y col., 2008). Esto denota su escasa contribución al proceso de recaptación de glutamato. Dado que los estímulos estresantes aplicados en nuestro estudio pueden considerarse estímulos no patológicos dependientes de la experiencia, estos escenarios extremos probablemente no representan los de nuestro modelo. Si bien a partir de nuestros resultados no podemos asegurar el sitio de expresión de este transportador, estas evidencias remarcan que el GLT-1 expresado en los astrocitos es el principal contribuyente a la homeostasis de glutamato.

En consistencia con la persistente disminución de la expresión de GLT-1 inducida por estrés, nuestros resultados demostraron una reducida actividad astrogial evidenciada por una marcada reducción de la inmunoreactividad de GFAP. Aunque existen resultados divergentes, la reducción de la expresión de GFAP parece ser una de las características distintivas de la exposición a estrés crónico (Popoli y col., 2012). Nuestros hallazgos son altamente consistentes con evidencias que muestran una marcada reducción de GFAP en paralelo a una reducción de GLT-1. Aunque todavía no se ha dilucidado la vía de señalización intracelular que media el efecto proactivo del estrés crónico sobre la expresión de los transportadores de glutamato, se ha encontrado una estrecha relación entre el citoesqueleto de GFAP y GLT-1.

Estudios *in vitro* desarrollados a través de astrocitos, provenientes de ratones que carecen del gen que codifica para GFAP (KO GFAP $-/-$), demostraron una importante reducción de la captación de glutamato mediada por la incapacidad de tráfico de GLT-1 hacia la membrana plasmática de los astrocitos (Hughes y col., 2004), lo que sugiere que GFAP es una proteína crítica de andamiaje que media la expresión de GLT-1 en superficie de membrana y comprueba la participación de GFAP en el transporte de glutamato.

Por otra parte, estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido que la interacción neurona-astrocito es necesaria tanto para la activación transcripcional de GLT-1 (Yang y col., 2009a), como para los procesos no transcripcionales que intervienen en las funciones de regulación sináptica específicas de los astrocitos, como el tráfico y la estabilización en la membrana plasmática o el *clustering* de GLT-1 (Nakagawa y col., 2008; Zhou y Sutherland, 2004). En apoyo a estos hallazgos, tras la discontinuación de la autoadministración crónica de cocaína o nicotina, asociada a una disminución de GLT-1 (Knackstedt y col., 2010; Namba y col., 2019), se observó una reducida expresión de GFAP en NAc core (Namba y col., 2019; Scofield y col.,

2016b). Paralelamente, tras la administración crónica de cocaína se reportó una disminución en el tamaño astrocítico y una reducción del contacto neurona-astrocito que fueron revertidos por un tratamiento con ceftriaxona (Scofield y col., 2016b), un potenciador de la expresión de GLT-1 que bloquea la reinstalación a la búsqueda de cocaína (Knackstedt y col., 2010). Estos resultados sugieren que la sinapsis glutamatérgica coordina la función astrogliar, lo que lleva a pensar que cualquier cambio en la transmisión glutamatérgica, como en el caso del aumento de la liberación de glutamato en respuesta a la exposición a estrés (Moghaddam, 1993; Moghaddam y col., 1994; Popoli y col., 2012) o a la administración de cocaína (Reid y Berger, 1996), se asocia a una alteración funcional de los astrocitos y, por consiguiente, una alterada homeostasis de glutamato.

De esta manera teniendo en cuenta nuestros resultados, la alteración de la transmisión glutamatérgica, la disminución de la expresión de GLT-1 y la reducida inmunoreactividad de GFAP tras la exposición a estrés crónico denotan la existencia de cambios funcionales críticos en los astrocitos que contribuyen a la vulnerabilidad a la adicción a cocaína. Este estudio demuestra que estas alteraciones son mediadas por la microglía, ya que minociclina, al restaurar tanto la morfología como la función microglial y los niveles de ARNm que codifican para TNF- α , fue capaz de normalizar la inmunoreactividad de GFAP, la expresión de GLT-1 y las concentraciones basales de glutamato extracelular en NAc core. Importantemente, estos resultados manifiestan que la alteración del funcionamiento astrogliar puede ser consecuencia del estado hiper-reactivo microglial observado, lo que sugiere que la microglía contribuiría cascada arriba de los astrocitos como mediador clave de la disminución de la expresión de GLT-1 promoviendo, consecuentemente, la desregulación de la homeostasis de glutamato. En apoyo a estas evidencias, se ha demostrado que las células microgliales se activan antes que los astrocitos y, una vez activadas, promueven señales para estimularlos (Liu y col., 2011), lo que denota un patrón de actividad temporalmente distinto entre estas células. En el mismo sentido, la activación de la microglía se ha colocado cascada arriba de los astrocitos en la regulación de la transmisión glutamatérgica que media el aumento de la frecuencia de corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC) (Pascual y col., 2012).

El GLT-1 está estratégicamente ubicado en los procesos gliales vecinos a la hendidura sináptica propiciando la eliminación rápida y eficiente del glutamato liberado sinápticamente con el objetivo principal de mantener concentraciones óptimas de glutamato extracelular (Minelli y col., 2001; Cholet y col., 2002). Por lo tanto, es razonable esperar que cualquier perturbación en la captación de glutamato altere la señalización de este neurotransmisor. Así, la relevancia biológica de la disminución de la expresión de GLT-1 inducida por estrés crónico en NAc core radica en que este evento impide la eficiente recaptación de glutamato extracelular provocando dos importantes consecuencias: 1) el derrame de glutamato sináptico al espacio

extrasináptico que activa los mGluR perisinápticos, y 2) la supresión del efecto protector de GLT-1 sobre el impacto postsináptico del glutamato extracelular.

En primer lugar, el desborde de glutamato fuera de la hendidura sináptica se evidencia claramente por la atenuación de la liberación de glutamato en NAc core tras la inyección aguda de cocaína en los animales pre-estresados. A nivel postsináptico, este evento está respaldado por estudios de nuestro laboratorio que demuestran que una sola sesión de estrés por restricción de movimiento es capaz de inducir un prolongado tiempo de decaimiento de las corrientes NMDA mediadas por la subunidad NR2B en NAc core 21 días después del episodio de estrés (García-Keller y col., 2016). Específicamente, estos receptores glutamatérgicos se encuentran típicamente situados a una distancia considerable de la sinapsis (Shen y col., 2014), lo que también apoya la hipótesis de derrame de glutamato. Más aún, la activación de los receptores NMDA extrasinápticos fue suprimida tras la modulación farmacológica de la expresión y función de GLT-1 mediante un tratamiento con ceftriaxona (García-Keller y col., 2016).

En segundo lugar, el aumento sostenido de los niveles basales de glutamato extracelular debido a la reducción de la expresión de GLT-1 contribuye a alteraciones funcionales postsinápticas asociadas a complejos cambios estructurales en las MSNs que subyacen el desarrollo de conductas adictivas inducidas por estrés (García-Keller y col., 2013, 2016).

Rol de las células gliales en las neuroadaptaciones estructurales postsinápticas inducidas por la exposición a estrés crónico en NAc core.

Las alteraciones de los mecanismos glutamatérgicos han sido asociadas a cambios en la plasticidad sináptica (Kalivas, 2009). Particularmente, los cambios adaptativos postsinápticos en las MSNs de NAc fueron propuestos como alteraciones duraderas que subyacen a las conductas adictivas. Incluso, se ha postulado que los cambios estructurales en las espinas dendríticas de las MSNs de NAc observados tras la exposición a drogas de abuso contribuirían a la persistencia del proceso adictivo (Kalivas, 2009; Spiga y col., 2014).

Una medida de la plasticidad sináptica que ha recibido mucha atención en la literatura referida al estudio de la adicción es la densidad de espinas dendríticas. El balance entre espinas maduras e inmaduras también se ha reportado como un aspecto importante de la plasticidad sináptica. De hecho, cambios en este balance constituyen la base de la plasticidad dependiente de la experiencia (Keck y col., 2008; Yang y col., 2009b). En relación a esto, en este estudio demostramos que el estrés crónico es capaz de inducir un aumento de la densidad de espinas dendríticas totales y de espinas tipo *mushroom*, mientras que no se observaron diferencias significativas entre las condiciones Estrés y No-Estrés en cuanto a la densidad de espinas tipo *thin* o *stubby* en NAc core.

En correlación con nuestros resultados, un estudio recientemente publicado realizado bajo un protocolo de estrés por derrota social reportó un incremento en la densidad de espinas totales en NAc core 24 h después de la última sesión de estrés (Fox y col., 2020). En el mismo sentido, se evidenció un incremento persistente de la densidad de espinas dendríticas totales 21 días luego de la exposición a estrés agudo por restricción de movimiento (García-Keller y col., 2016). De modo similar, se ha reportado que la exposición a cocaína provoca un aumento en la densidad de espinas dendríticas en las MSNs (Cahill y col., 2018; Kim y col., 2011; Lee y col., 2006; Robinson y Kolb, 1999; Toda y col., 2010).

Además, en consistencia con nuestros hallazgos, no se observó ninguna influencia de la exposición a estrés crónico por inmovilización sobre las espinas de tipo *thin* o *stubby* (Kasai y col., 2010). Sin embargo, estudios reportaron incremento de espinas dendríticas tipo *stubby* en las MSNs de NAc 24 hs después de llevar a cabo un protocolo de estrés por derrota social (Christoffel y col., 2011). De manera similar, bajo un protocolo de estrés semejante se reportó un incremento en la densidad de espinas tipo *thin* y *stubby* en las D2-MSNs de NAc core (Fox y col., 2020). En relación a los resultados observados en el presente estudio, dado que los cambios estructurales postsinápticos son altamente dinámicos y debido a la diferencia temporal entre la medición realizada en este estudio y la reportada por estos laboratorios, es probable que las alteraciones descritas por ambos autores pueda tratarse de un cambio morfológico inicial, potencialmente encaminado a convertirse en espinas de tipo *mushroom* conforme transcurre el tiempo.

La importancia de la observación de un incremento de la densidad de espinas tipo *mushroom*, radica en que estas se caracterizan por ser de mayor tamaño y por formar sinapsis fuertes (Harris y Kater, 1994). Además, los cambios morfológicos de las espinas podrían constituir la base estructural de cambios plásticos neuroadaptativos como el aumento postsináptico de los receptores AMPA (Golden y Russo, 2012). En este contexto, se ha reportado que el cambio morfológico de las espinas podría ser un efecto secundario del tráfico de receptores a la membrana neuronal, producto de la inserción de receptores AMPA al fusionarse la membrana vesicular que contiene los receptores con la membrana plasmática de la espina (Kopeck y col., 2006; Park y col., 2004, 2006). En general, se ha demostrado que el tráfico de receptores a la membrana está asociado a un cambio morfológico de las espinas dendríticas, observándose que las espinas con cabezas de mayor tamaño presentan mayor densidad de receptores AMPA en superficie de membrana (Kasai y col., 2003; Matsuzaki y col., 2001).

Por otro lado, dado que la función más importante de las espinas dendríticas es detectar los niveles de glutamato extracelular (Kasai y col., 2003), es razonable pensar que el aumento duradero de la densidad de espinas dendríticas tipo *mushroom* que se observa en NAc core, pueda atribuirse al aumento persistente de las concentraciones basales de glutamato extracelular

dependiente de la alteración microglial inducida por la exposición a estrés crónico. En consistencia con las evidencias reportadas en animales expuestos a un periodo prolongado libre de droga tras la administración crónica de cocaína (Kalivas, 2009; Russo y col., 2010), postulamos que nuestros resultados probablemente representan un evento compensatorio homeostático. Así, el efecto modulador negativo del aumento sostenido de las concentraciones basales de glutamato extracelular inducido por estrés sobre la liberación sináptica de glutamato daría lugar a un aumento basal persistente de la densidad de espinas tipo *mushroom* como compensación homeostática en NAc core. Consistentemente, resultados previos de nuestro laboratorio indicaron una mayor expresión de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA en superficie de membrana, un aumento de la PSD y de la dinámica del citoesqueleto de actina en NAc core 45 min después de la inyección i.p. de una dosis aguda de cocaína en animales previamente expuestos a estrés crónico (Esparza y col., 2012). Más aún, se ha reportado que estas robustas alteraciones plásticas adaptativas a nivel postsináptico, en parte, convierten una sinapsis silenciosa en una sinapsis funcional (Dong y Nestler, 2014). Estos datos sugieren que, aunque el estrés crónico desencadena un aumento duradero de la densidad de espinas tipo *mushroom*, el cambio morfológico puede no albergar la maquinaria para aumentar la fuerza sináptica a menos que se inyecte cocaína. Así, el aumento del tamaño de la espina dendrítica por la exposición a estrés crónico puede ser un evento homeostático, mientras que el aumento de la fuerza sináptica es un evento más bien transitorio inducido por cocaína. Esta hipótesis se correlaciona con el concepto de *t-sp* (*transient synaptic plasticity*). El término *t-sp* hace referencia a la potenciación sináptica transitoria de la proyección glutamatérgica prefrontal a NAc core, mecanismo que subyace a la reinstalación de la búsqueda de cocaína inducida por claves en animales que extinguieron la conducta de autoadministración de cocaína (Gipson y col., 2014; Spencer y col., 2017).

En conjunto estos hallazgos son consistentes con el cambio estructural bidireccional observado en el tamaño de la cabeza de las espinas dendríticas tras la administración no contingente de cocaína a animales sometidos a un protocolo de abstinencia tras la administración crónica de cocaína. Poco después de la inyección i.p. (45 min), el diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas aumentó en estrecha asociación con un incremento de la dinámica del citoesqueleto de actina y de los niveles de expresión de receptores AMPA observados a partir de los 30 min después de la dosis aguda de cocaína. Este evento fue atribuido a un aumento de glutamato extracelular procedente de fuente sináptica tras un estímulo de cocaína y se acompañó de una sustitución bidireccional de receptores AMPA que contienen la subunidad GluR2 por los que contienen la subunidad GluR1 (Anderson y col., 2008; Kalivas, 2009). A los 120 min, cuando se restablecieron los niveles de glutamato extracelular, el diámetro de la cabeza de las espinas se redujo significativamente. Este evento ha

sido vinculado a cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina y, aparentemente, a una reducción de la expresión de los receptores AMPA (Boudreau y col., 2007; Kalivas, 2009; Kourrich y col., 2007). Estos datos son consistentes con los reportados a los 15 minutos de presentada una clave asociada a la administración de nicotina (Gipson y col., 2013) y a los 45 minutos de una inyección i.p. de heroína (Shen y col., 2011), en animales que habían sido sometidos a un protocolo de extinción de la conducta de autoadministración tras la administración crónica de estas drogas de abuso. Consistentemente, un incremento en la liberación de glutamato en NAc core durante la reinstalación de la búsqueda de nicotina inducida por claves, ha sido relacionada a un potenciado incremento en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas de las MSNs, en comparación con el incremento observado tras la abstinencia de la droga. Estos resultados se correlacionaron con un incremento de las subunidades GluR1 de los receptores AMPA y, NR2A y NR2B de los receptores NMDA, cambios que consecuentemente denotaron un incremento en la relación de las corrientes AMPA/NMDA y un aumento en el tiempo de caída de las corrientes NMDA mediadas por la subunidad NR2B (Gipson y col., 2013). De manera similar, la exposición a claves asociadas a cocaína en animales que previamente fueron expuestos a la autoadministración crónica de cocaína, disparó rápidamente (a los 15 minutos) un incremento en el tamaño de las cabezas de las espinas dendríticas en NAc core (Gipson y col., 2014).

Con respecto al rol de la microglía en la plasticidad sináptica, interesantemente se ha sugerido que la microglía participaría en la remodelación de los circuitos neuronales tras la exposición a estímulos no patológicos dependientes de la experiencia (Tremblay y col., 2010). En consistencia con estas evidencias, nuestros resultados demostraron que el tratamiento sistémico con minociclina es capaz de restaurar la densidad de espinas totales y la densidad de espinas tipo *mushroom* en NAc core en los animales pre-estresados. Curiosamente, minociclina además demostró tener un efecto *per se* sobre la densidad de espinas dendríticas tipo *thin*. Este efecto se evidenció por una marcada disminución de este tipo de espinas tanto en los animales pre-estresados como en los no estresados que recibieron el tratamiento antibiótico. Con respecto a este resultado, estudios *in vitro* reportaron que minociclina tiene un efecto *per se* capaz de inducir la maduración de espinas dendríticas, disminuyendo el porcentaje de espinas inmaduras emparentadas a las tipo *thin* e incrementando el porcentaje de espinas maduras como las tipo *mushroom* (Bilousova y col., 2009). Por lo tanto, en nuestro estudio es probable que estemos observando un efecto de reestructuración dual de minociclina: 1) la disminución de la densidad de espinas inmaduras tipo *thin* y, 2) la restauración de la densidad de espinas totales y de espinas tipo *mushroom*.

El estudio de la microglía y su participación en la plasticidad sináptica y la remodelación estructural postsináptica es un campo que está emergiendo. En el área de la

neurociencia de la adicción, la bibliografía que reporta una asociación entre alteraciones funcionales de la microglía y cambios electrofisiológicos inducidos por drogas de abuso es escasa (Lewitus y col., 2016; McGrath y Briand, 2019). Incluso, aún no ha sido explorada la relación existente entre activación de la microglía y los cambios plásticos estructurales en las MSNs de NAc. Lo mismo ocurre con las líneas de investigación enfocadas en el estudio de la influencia del estrés en NAc y la vulnerabilidad al desarrollo de adicción (McGrath y Briand, 2019), por lo que los resultados descriptos en esta tesis constituyen una importante plataforma para futuros estudios enfocados en la comorbilidad entre trastornos de estrés y desórdenes en el uso de sustancias psicoactivas.

Por otro lado, las células gliales se han visto implicadas en la regulación de la plasticidad sináptica de tal manera que la respuesta inmune también puede influir directamente en la plasticidad sináptica, a través de la señalización de importantes mediadores inflamatorios como las citoquinas TNF- α e IL-1 β (Yirmiya y Goshen, 2011). Particularmente, se ha demostrado el rol relevante de la microglía en la respuesta adaptativa de TNF- α asociada a alteraciones en la relación de las corrientes AMPA/NMDA en NAc tras la administración no contingente repetida de cocaína (Lewitus y col., 2016). En consistencia con estas evidencias, estudios demuestran un aumento homeostático compensatorio de la fuerza sináptica en respuesta a un bloqueo prolongado de la actividad sináptica glutamatérgica. Dicha alteración ha sido asociada a un incremento del tráfico de receptores AMPA hacia la membrana postsináptica mediado por TNF- α (Stellwagen y col., 2005; Stellwagen y Malenka, 2006). Estas evidencias sugieren que esta citoquina ejerce un rol importante en la inducción de neuroadaptaciones postsinápticas y en la regulación de la fuerza sináptica (Stellwagen y Malenka, 2006; Lewitus y col., 2016). En conjunto, estos hallazgos se correlacionan significativamente con los resultados presentados en esta tesis y nuestras evidencias previamente publicadas (Esparza y col., 2012; García-Keller y col., 2013, 2016). Así, la activación de microglía podría desencadenar cambios neuroplásticos mediante una combinación de eventos mediados por TNF- α . Además de interrumpir el mecanismo astroglial de recaptación de glutamato, el TNF- α también podría facilitar la hipersensibilidad neuronal al glutamato extracelular a través del aumento de la expresión de los receptores AMPA a nivel postsináptico. De este modo, tanto el incremento de TNF- α y la propagación de su señalización inflamatoria a nivel postsináptico como el aumento de glutamato basal en animales sometidos previamente a estrés, contribuirían al desarrollo de alteraciones estructurales de las espinas dendríticas. Esta hipótesis se apoya en los resultados presentados en esta tesis, ya que el tratamiento con minociclina, por su efecto inhibitorio sobre la activación de la microglía y su acción anti-inflamatoria, restauró no sólo la homeostasis glutamatérgica sino también los cambios plásticos estructurales postsinápticos en NAc core y

consecuentemente mitigó las alteraciones conductuales observadas en los animales pre-estresados.

Por otro lado, aunque en nuestro estudio el incremento de los niveles de IL-1 β no resultaron estadísticamente significativos, es importante destacar que la señalización de IL-1 β de origen microglial, observada en un modelo experimental de dolor crónico, también facilita la fuerza sináptica (Clark y col., 2015).

En resumen, a partir de las evidencias demostradas en nuestro estudio es posible establecer una asociación temporal y mecánica entre la desregulación de la homeostasis de glutamato mediada por la alteración funcional de la microglía en NAc core inducida por estrés y los resultados reportados previamente por nuestro laboratorio que indicaron una alteración en la remodelación del citoesqueleto de actina acompañada de un incremento de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA en NAc core y el incremento de la fuerza sináptica evidenciado por un aumento en la relación de las corrientes AMPA/NMDA en un modelo de sensibilización cruzada estrés-cocaína (Esparza y col., 2012; García-Keller y col., 2013; 2016). En este sentido, las respuestas conductuales alteradas frente a la administración de cocaína, observadas en animales previamente estresados, pone en evidencia la importancia de caracterizar cómo los cambios neuroplásticos provocados por la exposición a estrés alteran la subsecuente plasticidad disparada por cocaína, favoreciendo el incremento de los receptores AMPA en superficie de membrana en NAc core.

Nuestros resultados, en conjunto plantean la posibilidad de un incremento en la fuerza de la transmisión sináptica excitatoria en NAc core luego de la exposición a estrés crónico. Finalmente, para determinar si los cambios estructurales en NAc core descritos en este estudio están asociados a una alteración en la función sináptica y el funcionamiento de los circuitos neurales que subyacen al proceso adictivo, se requieren futuros estudios con enfoques electrofisiológicos.

Estrés y vulnerabilidad a la adicción a cocaína: rol de proteínas gliales como reguladoras de la plasticidad estructural en NAc core.

Entre las adaptaciones celulares más prominentes presentes luego de largos períodos libres de droga, se encuentran los cambios en la expresión de los receptores glutamatérgicos implicados en la regulación de la transmisión glutamatérgica, tanto pre como postsinápticos, y el aporte glial a los mecanismos glutamatérgicos en NAc core. Las evidencias aquí presentadas y la amplia literatura que respalda estos resultados ponen de manifiesto la existencia de neuroadaptaciones compartidas tras la exposición a estrés y drogas de abuso, destacando la estrecha relación existente entre la transmisión glutamatérgica y la función glial.

En relación a los mecanismos moleculares que subyacen a la interacción entre la exposición a estrés y el abuso de drogas, este estudio aporta evidencias contundentes acerca del rol crítico jugado por la microglía en la modulación de la transmisión glutamatérgica en NAc core, un eslabón fundamental en los mecanismos neurobiológicos implicados en la vulnerabilidad al desarrollo de adicción inducida por estrés crónico. La desregulación de los mecanismos glutamatérgicos mediada por la microglía, tras la exposición crónica a eventos estresantes, sienta las bases para posteriores adaptaciones postsinápticas en NAc core, lo que se convierte en un escenario propicio para desencadenar la potenciación de los efectos de cocaína, y promover una duradera vulnerabilidad al desarrollo de la adicción a cocaína.

Específicamente, a partir de este estudio proponemos que los persistentes cambios morfológicos y funcionales microgliales acompañados de un incremento de la expresión génica de TNF- α en NAc core, inducidos por la exposición a estrés crónico, estarían asociados a la disminución de la expresión de GLT-1 mediada por la acción de TNF- α sobre los astrocitos, ya que esta citoquina ha sido reportada como un mediador clave que dispara la activación de una cascada de señalización intracelular a nivel astroglial que culminaría en la expresión génica alterada de GLT-1 vía NFkB (Tilleux y Hermans, 2007; Tolosa y col., 2011; Zou y Crews, 2005). La disminución de la recaptación de glutamato, a expensas de la expresión reducida de GLT-1, retrasa la eliminación del neurotransmisor de la hendidura sináptica favoreciendo la amplificación de la magnitud de la transmisión glutamatérgica.

Importantemente, los resultados aquí obtenidos demostraron que el tratamiento con minociclina, mediante su acción sobre la actividad de la microglía y su efecto anti-inflamatorio, restauró los niveles de GFAP y GLT-1, promoviendo la normalización del glutamato extracelular basal y restableciendo la homeostasis glutamatérgica en NAc core, lo que sugiere que este mecanismo estaría mediado por la microglía y, particularmente, por un perfil de respuesta proinflamatoria inducido por estrés. Estos eventos moleculares estarían asociados funcional y temporalmente entre sí, ya que sugieren mecanísticamente que la acción de la microglía se colocaría cascada arriba de la actividad de astrocitos, actuando como un mediador crítico de la disminución de GLT-1, con la consecuente desregulación de la homeostasis de glutamato en NAc core que subyace a los cambios conductuales observados.

Además, la reducción de la expresión de GLT-1 permite que el glutamato liberado sinápticamente acceda a los compartimentos no sinápticos (Kalivas, 2009; Pál, 2018) favoreciendo el incremento del glutamato basal en NAc core. Este evento bioquímico explicaría la liberación atenuada de glutamato en respuesta a la administración no contingente de cocaína por acción del glutamato sobre los receptores autoinhibitorios presinápticos mGluR2/3. Este derrame de glutamato, además, podría desencadenar dos eventos importantes. Por un lado, este evento podría contribuir a la persistente alteración morfológica y funcional de la microglía,

favoreciendo el mantenimiento de los niveles de glutamato basal elevados, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva. Por otro lado, podría activar de manera persistente los receptores mGluR y NMDA, que contienen la subunidad NR2B, evento que ha sido observado tras la exposición a estrés o la discontinuación de la administración crónica de cocaína (García-Keller y col., 2016; Kalivas y col., 2003) y que se acompaña de prominentes cambios plásticos estructurales y en la excitabilidad neuronal, particularmente la potenciación sináptica, en NAc core (García-Keller y col., 2016; Kalivas, 2009).

Es ampliamente aceptado que la conducta está impulsada por la actividad neuronal. La actividad neuronal está determinada por la suma neta de las señales neuroquímicas que impactan a nivel postsináptico sobre los receptores glutamatérgicos ionotrópicos expresados en las espinas dendríticas. Los receptores AMPA y particularmente la subunidad GluR1 se han reportado incrementados en NAc core tras la desregulación de la homeostasis de glutamato en animales estresados (García-Keller y col., 2013), tras la administración no contingente de cocaína en animales sometidos previamente a estrés crónico (Esparza y col., 2012) y frente al aumento de TNF- α que constituye una señal crítica para incrementar su expresión postsináptica en regiones cerebrales implicadas en las conductas adictivas (Stellwagen y col., 2005; Stellwagen y Malenka, 2006).

La participación de genes que codifican proteínas efectoras de la inmunidad innata en la reducción de los transportadores de glutamato y la consiguiente hiperexcitabilidad neuronal, reduciría la función de control conductual ejercida por la proyección glutamatérgica prefrontal hacia NAc core, un eje crítico de la neurobiología de la adicción (Crews y col., 2017). De esta manera, estos persistentes cambios neuroadaptativos en el sistema mesocorticolímbico orquestados por la exposición crónica a estrés, contribuirían de manera determinante al incremento de la vulnerabilidad a la adicción en animales previamente expuestos a estrés y serían los responsables de facilitar la conducta de autoadministración de cocaína y de potenciar la actividad psicomotora en respuesta a cocaína en animales estresados.

Importantemente, los datos obtenidos a partir de estudios en modelos animales de adicción y recaída, se correlacionan con resultados de estudios de neuroimágenes en humanos que demuestran que la presentación de claves apareadas a las drogas, a individuos que padecen adicción, provoca la activación metabólica de la proyección glutamatérgica de CPf a NAc (Goldstein y Volkow, 2002). Estudios *post-mortem* en cerebros humanos demostraron una mayor activación microglial, en núcleos cerebrales que conforman el circuito de recompensa, en consumidores crónicos de cocaína (Little y col., 2009) y particularmente en estriado, en individuos consumidores crónicos de metanfetamina (Sekine y col., 2008). Sorprendentemente, la activación microglial se observó al menos dos años después de la abstinencia de metanfetamina en humanos (Sekine y col., 2008). Evidencias recientes demostraron que

personas que padecían adicción a cocaína, y habían experimentado eventos traumáticos a lo largo de sus vidas, tenían niveles elevados de citoquinas proinflamatorias circulantes, en comparación con aquellos que padecían adicción a cocaína, pero sin exposición a situaciones traumáticas (Lo Iacono y col., 2018). Estos interesantes hallazgos en humanos son evidencias contundentes que apoyan el mecanismo propuesto (figura 41).

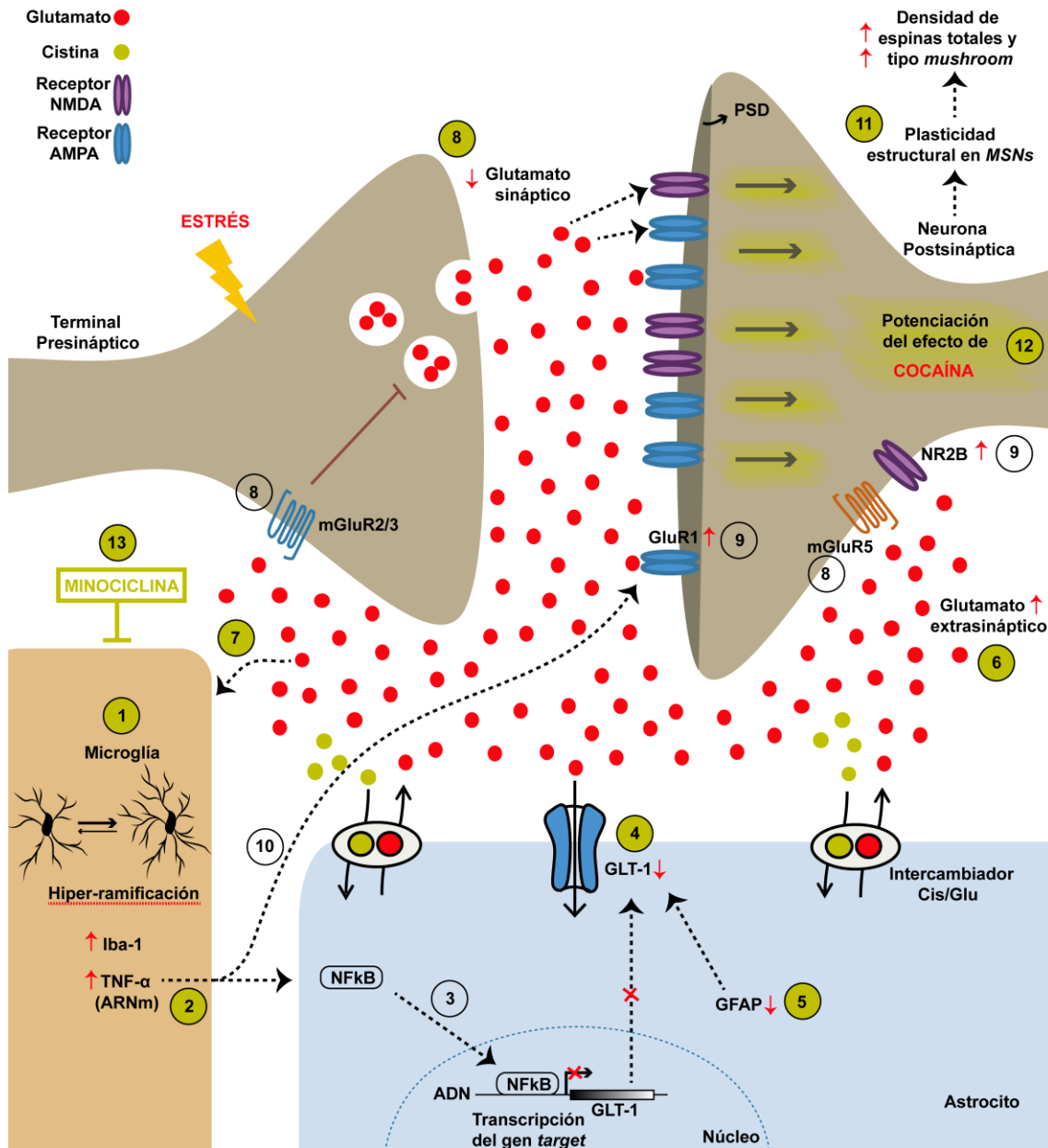


Figura 41. Esquema que esboza una versión simplificada del mecanismo propuesto en NAc core, el cual involucra los resultados de nuestro y otros laboratorios. Los números resaltados con color verde corresponden a los resultados obtenidos en la presente tesis. 1) Cambios morfológicos y funcionales de la microglía inducidos por la exposición a estrés crónico. 2) Incremento de la expresión génica de TNF- α . 3) Activación de cascada intracelular en astrocitos que culmina en la alteración de la expresión génica de GLT-1 por bloqueo de la transcripción mediado por NF κ B. 4) Disminución de la expresión de GLT-1 con el consecuente retraso de la eliminación de glutamato de la hendidura

sináptica. 5) Perturbación de la función astrogial, evidenciada por una reducción en la expresión de GFAP, vinculada a la alteración del transporte de glutamato. 6) Derrame del neurotransmisor al espacio extrasináptico e incremento de glutamato basal extracelular, contribuyendo a: 7) la persistente alteración funcional de la microglía e incremento de la concentración de glutamato basal mediante un mecanismo de retroalimentación positiva, 8) la alteración en la señalización de los receptores metabotrópicos pre y postsinápticos, particularmente a nivel presináptico alterando la liberación de glutamato vesicular en respuesta a cocaína por acción del incremento de glutamato basal sobre los receptores autoinhibitorios mGluR2/3, y 9) la amplificación de la magnitud de la transmisión glutamatérgica mediada por la subunidad NR2B de los receptores NMDA de localización extrasináptica y la subunidad GluR1 de los receptores AMPA de localización sináptica, 10) este último cambio también modulado por TNF- α . 11) Prominente remodelación estructural postsináptica consecuyente a cambios en la señalización de los receptores postsinápticos. 12) Potenciación del efecto estimulante motor y reforzante de cocaína tras la administración de cocaína. 13) Minociclina, por su acción restauradora de la función microglial y su efecto anti-inflamatorio, restablece la homeostasis glutamatérgica en NAc core y suprime la capacidad del estrés para facilitar la autoadministración de cocaína y potenciar la actividad psicomotora en respuesta a cocaína.

Finalmente, este estudio representa una importante vía para avanzar en la comprensión de los mecanismos que subyacen a la comorbilidad entre la exposición a estrés y el abuso de drogas, y proporciona pruebas del efecto neuroprotector de la minociclina. Cabe destacar que la importancia del empleo de esta tetraciclina radica en que este compuesto, se encuentra clínicamente disponible y puede ser, por lo tanto, rápidamente utilizado en ensayos clínicos para evaluar su impacto en el tratamiento de pacientes que padecen comorbilidad entre desórdenes de estrés y desórdenes en el uso de sustancias psicoactivas. Más aún, la seguridad demostrada a lo largo de los años en la práctica clínica beneficia el potencial de este fármaco para el tratamiento de esta comorbilidad dual en humanos. Este trabajo de tesis brinda importantes resultados que constituyen una sólida plataforma para futuras investigaciones que tengan como objetivo profundizar el estudio del mecanismo propuesto, y propone a la minociclina como un agente terapéutico prometedor para prevenir la comorbilidad entre estrés y abuso de drogas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abercrombie, E.A., 1989. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 52, 1655-8.
- Aguzzi, A., Barres, B.A., Bennett, M.L., 2013. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science.* 339, 156-161.
- Albrecht, J., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Zielinska, M., Aschner, M., 2010. Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol.* 6(4), 263-76.
- Almeida, R.F., Thomazi, A.P., Godinho, G.F., Saute, J.A., Wofchuk, S.T., Souza, D.O., Ganzella, M., 2010. Effects of depressive-like behavior of rats on brain glutamate uptake. *Neurochem. Res.* 35, 1164–1171.
- Amara, S.G., Fontana, A.C., 2002. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* 41(5), 313-318.
- Anagnostaras, S.G., Robinson, T.E., 1996. Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. *Behavioral Neuroscience*, 110, 1397–1414.
- Anderson, S.M., Famous, K.R., Sadri-Vakili, G., Kumaresan, V., Schmidt, H.D., Bass, C.E., Terwilliger, E.F., Cha, J.H., Pierce, R.C., 2008. CaMKII: a biochemical bridge linking accumbens dopamine and glutamate systems in cocaine seeking. *Nat. Neurosci.* 11, 344-353.
- Anderson, C.M., Swanson, R.A., 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia.* 32, 1-14.
- Angrist, B., 1994. Amphetamine psychosis: clinical variations of the syndrome, in: Cho, A.K. and Segal, D.S. (Eds) *Amphetamine and Its Analogs: psychopharmacology, toxicology and abuse*, pp. 387-414 (New York, Academic Press).
- Antelman, S.M., Eichler, A.J., Black, C.A., Kocan, D., 1980. Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. *Science.* 207, 329-331.
- Antelman, S., 1988. Time-dependent sensitization as the cornerstone for a new approach to pharmacotherapy: drugs as foreign/stressful stimuli. *Drug Development Res.* 14, 1-30.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Hydon, P.G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208-215.
- Argilli, E., Sibley, D.R., Malenka, R.C., England, P.M., Bonci, A., 2008. Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 28, 9092-9100.
- Arriza, J.L., Fairman, W.A., Wadiche, J.I., Murdoch, G.H., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1994. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci.* 14, 5559-5569.
- Arroyo, D.S., Gaviglio, E.A., Peralta Ramos, J.M., Bussi, C., Avalos, M.P., Cancela, L.M., Iribarren, P., 2018. Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors regulate peptidoglycan-induced myeloid leukocyte recruitment, inflammation, and neurotoxicity in mouse brain. *Front. Immunol.* 9, 770.
- Assis, M.A., Hansen, C., Lux-Lantos, V., Cancela, L.M., 2009. Sensitization to amphetamine occurs simultaneously at immune level and in met-enkephalin of the nucleus accumbens and spleen: an involved NMDA glutamatergic mechanism. *Brain Behav. Immun.* 23, 464-473.
- Attwell, D., Mobbs, P., 1994. Neurotransmitter transporters. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4(3), 353-359.
- Baker, D.A., McFarland, K., Lake, R.W., Shen, H., Tang, X-C., Toda, S., Kalivas, P.W., 2003. Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat. Neurosci.* 6, 743-9.
- Baker, D.A., Xi, Z., Shen, H., Swanson C.J., Kalivas, P.W., 2002. The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J. Neurosci.* 22(20), 9134-9141.
- Bale, T.L., Vale, W.W., 2004. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 525-557.
- Balleine, B.W., Liljeholm, M., Ostlund, S.B., 2009. The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behav. Brain Res.* 199, 43-52.
- Barañano, D.E., Ferris, C.D., Snyder, S.H., 2001. Atypical neural messengers. *Trends Neurosci.* 24, 99-106.
- Bassareo, V., Di Chiara, G., 1999. Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/ core compartments. *Neuroscience.* 89, 637-641.
- Barger, S.W., Goodwin, M.E., Porter, M.M., Beggs, M.L., 2007. Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *J. Neurochem.* 101, 1205-1213.

- Baude, A., Nusser, Z., Roberts, J.D.B., Mulvihill, E., McIlhinney, R.A.J., Somogyi, P., 1993. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 α) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron*. 11, 771-787.
- Beart, P.M., O'Shea, R.D., 2007. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br. J. Pharmacol.* 150, 5-17.
- Béchéde, C., Cantaut-Belarif, Y., Bessis, A., 2013. Microglial control of neuronal activity. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 32.
- Beckstead, M.J., Gantz, S.C., Ford, C.P., Stenzel-Poore, M.P., Phillips, P.E., Mark, G.P., Williams, J.T., 2009. CRF enhancement of GIRK channel-mediated transmission in dopamine neurons. *Neuropsychopharmacology*. 34, 1926-1935.
- Belin, D., Belin-Rauscent, A., Murray, J.E. & Everitt, B.J., 2013. Addiction: failure of control over maladaptive incentive habits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 564-572.
- Bellone, C., Lüscher, C., 2005. mGluRs induce a long-term depression in the ventral tegmental area that involves a switch of the subunit composition of AMPA receptors. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1280-1288.
- Bennett, M.R., 2000. The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog. Neurobiol.* 60, 109-137.
- Benwell, M.E., Balfour, D.J., 1992. The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *Br. J. Pharmacol.* 105(4), 849-856.
- Berger, U.V., Hediger, M.A., 1998. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anat. Embryol. Berl.* 198, 13-30.
- Berger, U.V., Hediger, M.A., 2000. Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* 421:385-399.
- Berger, U.V., Hediger, M.A., 2001. Differential distribution of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in tanycytes of the third ventricle. *J. Comp. Neurol.* 433, 101-114.
- Bergles, D.E., Tzingounis, A.V., Jahr, C.E., 2002. Comparison of coupled and uncoupled currents during glutamate uptake by GLT-1 transporters. *J. Neurosci.* 22, 10153-10162.
- Bergles, D.E., Diamond, J.S., Jahr, C.E., 1999. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9(3), 293-298.
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., 1995. The mind of an addicted brain: neural sensitization of wanting versus liking. *Curr. Dir. Psychol. Sci.* 4, 71-76.
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res. Rev.* 28, 309-369.
- Beyer, C.E., Stafford, D., LeSage, M.G., Glowa, J.R., Steketee, J.D., 2001. Repeated exposure to inhaled toluene induces behavioral and neurochemical cross-sensitization to cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*. 154, 198-204.
- Beynon, S.B., Walker, F.R., 2012. Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience*. 225, 162-171.
- Bezzi, P., Volterra, A., 2001. A neuron-glia signaling network in the active brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 387-394.
- Bilousova, T.V., Dansie, L., Ngo, M., Aye, J., Charles, J.R., Ethell, D.W., Ethell, I.M., 2009. Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. *J. Med. Genet.* 46, 94-102.
- Billups, B., Rossi, D., Attwell, D., 1996. Anion conductance behavior of the glutamate uptake carrier in salamander retinal glial cells. *J. Neurosci.* 16, 6722-6731.
- Blacktop, J.M., Seubert, C., Baker, D.A., Ferda, N., Lee, G., Graf, E.N., Mantsch, J.R., 2011. Augmented cocaine seeking in response to stress or CRF delivered into the ventral tegmental area following long-access self-administration is mediated by CRF receptor type 1 but not CRF receptor type 2. *J. Neurosci.* 31, 11396-11403.
- Blank, T., Prinz, M., 2013. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia*. 61, 62-70.
- Bleakman, D., Lodge, D., 1998. Neuropharmacology of AMPA and kainite receptors. *Neuropharmacol* 37, 187-204.
- Bliss, T.V.P., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361, 31-39.

- Boden, M.T., Kimerling, R., Jacobs-Lentz, J., Bowman, D., Weaver, C., Carney, D., Walser, R., Trafton, J.A., 2012. Seeking safety treatment for male veterans with a substance use disorder and PTSD symptomatology. *Addiction*. 107(3), 578-86.
- Boldyrev, A.A., Carpenter, D.O., Johnson, P., 2005. Emerging evidence for a similar role of glutamate receptors in the nervous and immune systems. *J. Neurochem.* 95, 913-918.
- Bonelli, R.M., Hodl, A.K., Hofmann, P., Kapfhammer, H.P., 2004. Neuroprotection in Huntington's disease: a 2-year study on minocycline. *Int Clin Psychopharmacol.* 19, 337-42.
- Bonci, A., Malenka, R.C., 1999. Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 19, 3723-3730.
- Boudreau, A.C., Ferrario, C.R., Glucksman, M.J., Wolf, M.E., 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., Reimers, J.M., Milovanovic, M., Wolf, M.E., 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, 10621-10635.
- Boudreau, A.C., Wolf, M.E., 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., Holly, E.N., Shimamoto, A., Albrechet-Souza, L., Weiner, L.A., De Bold, J.F., Miczek, K.A., 2014. Social stress and CRF-dopamine interactions in the VTA: role in long-term escalation of cocaine self-administration. *J. Neurosci.* 34, 6659-6667.
- Boyson, C.O., Miguel, T.T., Quadros, I.M., Debold, J.F., Miczek, K.A., 2011. Prevention of social stress-escalated cocaine self-administration by CRF-R1 antagonist in the rat VTA. *Psychopharmacology.* 218, 257-269.
- Bredt, D.S., Nicoll, R.A., 2003. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron.* 40(2), 361-379.
- Brigman, J.L., Wright, T., Talani, G., Prasad-Mulcare, S., Jinde, S., Seabold, G.K., Mathur, P., Davis, M.I., Bock, R., Gustin, R.M., Colbran, R.J., Alvarez, V.A., Nakazawa, K., Delpire, E., Lovinger, D.M., Holmes, A., 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.
- Brodnik, Z.D., Black, E.M., Clark, M.J., Kornsey, K.N., Snyder, N.W., España, R.A., 2017. Susceptibility to traumatic stress sensitizes the dopaminergic response to cocaine and increases motivation for cocaine. *Neuropharmacology.* 125, 295-307.
- Browman, K.E., Badiani, A., Robinson, T.E., 1998a. The influence of environment on the induction of sensitization to the psychomotor activating effects of intravenous cocaine in rats is dose-dependent. *Psychopharmacology.* 137, 90-98.
- Browman, K.E., Badiani, A., Robinson, T.E., 1998b. Modulatory effect of environmental stimuli on the susceptibility to amphetamine sensitization: a dose-effect study in rats. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 287, 1007-1014.
- Bungay, P.M., Newton-Vinson, P., Isele, W., Garris, P.A., Justice, J.B., 2003. Microdialysis of dopamine interpreted with quantitative model incorporating probe implantation trauma. *J. Neurochem.* 86, 932-946.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., Ellisman, M.H., 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22, 183-92.
- Cadoni, C., Di Chiara, G., 1999. Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine. *Neuroscience.* 90, 447-455.
- Cadoni, C., Pisanu, A., Solinas, M., Acquas, E., Di Chiara, G., 2001. Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. *Psychopharmacology (Berl).* 158(3), 259-266.
- Cadoni, C., Solinas, M., Di Chiara, G., 2000. Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. *Eur. J. Pharmacol.* 388, 69-76.
- Cahill, M.E., Walker, D.M., Gancarz, A.M., Wang, Z.J., Lardner, C.K., Bagot, R.C., Neve, R.L., Dietz, D.M., Nestler, E.J., 2018. The dendritic spine morphogenic effects of repeated cocaine use occur through the regulation of serum response factor signaling. *Mol. Psychiatry.* 23(6), 1474-1486.
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J., Barres, B.A., 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 28, 264-278.

- Calfa, G., Chapleau, C.A., Campbell, S., Inoue, T., Morse, S.J., Lubin, F.D., Pozzo-Miller, L., 2012. HDAC activity is required for BDNF to increase quantal neurotransmitter release and dendritic spine density in CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus*. 22, 1493-1500.
- Cami, J., Farre, M., 2003. Drug addiction. *N. Engl. J. Med.* 349, 975-986.
- Campioni, M.R., Xu, M., McGehee, D.S., 2009. Stress-Induced Changes in Nucleus Accumbens Glutamate Synaptic Plasticity. *J. Neurophysiol.* 101, 3192-3198.
- Cancela, L.M., Volosin, M., Molina, V.A., 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., Cancela, L.M., 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, 127-134.
- Cardinal, R.N., Everitt, B.J., 2004. Neural and psychological mechanisms underlying appetitive learning: links to drug addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 156-162.
- Carmen, J., Rothstein, J.D., Kerr, D.A., 2009. Tumor necrosis factor- α modulates glutamate transport in the CNS and is a critical determinant of outcome from viral encephalomyelitis. *Brain Research.* 1263, 143-154.
- Cartmell, J., Schoepp, D.D., 2000. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* 75(3), 889-907.
- Cearley, C.N., Blindheim, K., Sorg, B.A., Krueger, J.M., Churchill, L., 2011. Acute cocaine increases interleukin-1beta mRNA and immunoreactive cells in the cortex and nucleus accumbens. *Neurochem. Res.* 36, 686-692.
- Chamak, B., Morandi, V., Mallat, M., 1994. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J. Neurosci. Res.* 38, 221-233.
- Chang, J.Y., Janak, P.H., Woodward, D.J., 1998. Comparison of mesocorticolimbic neuronal responses during cocaine and heroin self-administration in freely moving rats. *J. Neurosci.* 18, 3098-115.
- Chang, J.Y., Paris, J.M., Sawyer, S.F., Kirillov, A.B., Woodward, D.J., 1996. Neuronal spike activity in rat nucleus accumbens during cocaine self-administration under different fixed-ratio schedules. *Neuroscience.* 74, 483-97.
- Chang, J.Y., Sawyer, S.F., Lee, R.S., Woodward, D.J., 1994. Electrophysiological and pharmacological evidence for the role of the nucleus accumbens in cocaine self-administration in freely moving rats. *J. Neurosci.* 14, 1224-44.
- Chaparro-Huerta, V., Rivera-Cervantes, M.C., Torres-Mendoza, B.M., Beas-Zarate, C., 2002. Neuronal death and tumor necrosis factor-alpha response to glutamate- induced excitotoxicity in the cerebral cortex of neonatal rats. *Neurosci. Lett.* 333, 95-98.
- Chapleau, C.A., Carlo, M.E., Larimore, J.L., Pozzo-Miller, L., 2008. The actions of BDNF on dendritic spine density and morphology in organotypic slice cultures depend on the presence of serum in culture media. *J. Neurosci. Methods.* 169, 182-190.
- Chefer, V., Thompson, A., Zapata, A., Shippenberg, T., 2009. An overview of brain microdialysis. *Curr. Protoc. Neurosci.* CHAPTER: Unit7. 11-35.
- Chen, K.C., 2006. Effects of tissue trauma on the characteristics of microdialysis zero-net-flux method sampling neurotransmitters. *J. Theor. Biol.* 238, 863-881.
- Chen, J.-C., Hsu-Chou, H., Lu, J.-L., Chiang, Y.-C., Huang, H.-M., Wang, H.-L., Wu, T., Liao, J.-J., Yeh, T.-S., 2005. Down-regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 in rat hippocampus and striatum and its modulation by a group III metabotropic glutamate receptor antagonist following transient global forebrain ischemia. *Neuropharmacology.* 49, 703-714.
- Chen, N.H., Reith, M.E., 1994. Autoregulation and monoamine interactions in the ventral tegmental area in the absence and presence of cocaine: a microdialysis study in freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271(3), 1597-610.
- Cheng, J.J., de Bruin, J.P., Feenstra, M.G., 2003. Dopamine efflux in nucleus accumbens shell and core in response to appetitive classical conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1306-1314.
- Cholet, N., Pellerin, L., Magistretti, P.J., Hamel, E., 2002. Similar perisynaptic glial localization for the Na⁺, K⁺-ATPase alpha 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex.* 12(5), 515-525.
- Christoffel, D.J., Golden, S.A., Dumitriu, D., Robison, A.J., Janssen, W.G., Ahn, H.F., Krishnan, V., Reyes, C.M., Han, M.-H., Ables, J.L., Eisch, A.J., Dietz, D.M., Ferguson, D., Neve, R.L., Greengard, P., Kim, Y., Morrison, J.H., Russo, S.J., 2011. IkkappaB kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. *J. Neurosci.* 31, 314-321.

- Churchill, L., Swanson, C.J., Urbina, M., Kalivas, P.W., 1999. Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J. Neurochem.* 72, 2397-2403.
- Clark, A.K., Gruber-Schoffnegger, D., Drdla-Schutting, R., Gerhold, K.J., Malcangio, M., Sandkuhler, J., 2015. Selective Activation of Microglia Facilitates Synaptic Strength. *J. Neurosci.* 35(11), 4552-4570.
- Clark, H.W., Masson, C.L., Delucchi, K.L., Hall, S.M., Sees, K.L., 2001. Violent traumatic events and drug abuse severity. *Journal of substance abuse treatment.* 20(2), 121-7.
- Coller, J.K., Hutchinson, M.R., 2012. Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence. *Pharmacol. Ther.* 134, 219-245.
- Collingridge, G.L., Lester, R.A., 1989. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 41(2), 143-210.
- Collingridge, G.L., Olsen, R.W., Peters, J., Spedding, M., 2009. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology.* 56(1), 2-5.
- Colton, C.A., Wilcock, D.M., 2010. Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 9, 174-191.
- Conn, P.J. Pin, J.P., 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 205-237.
- Conrad, K.L., Tseng, K.Y., Uejima, J.L., Reimers, J.M., Heng, L.J., Shaham, Y., Marinelli, M., Wolf, M.E., 2008. Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. *Nature.* 454(7200), 118-121.
- Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth, R.H., 1996. *Biochemical basis of neuropharmacology.* Oxford University Press, New York.
- Costello, D.A., Lyons, A., Denieffe, S., Browne, T.C., Cox, F.F., Lynch, M.A., 2011. Long term potentiation is impaired in membrane glycoprotein CD200-deficient mice: a role for Toll-like receptor activation. *J. Biol. Chem.* 286, 34722-34732.
- Cotman, C.W., Kahle, J.S., Miller, S.E., Ulas, J., Bridges, R.J., 1995. Excitatory amino acid transmission. In: Bloom, F.E., Kupfer, D.J. (eds). *Psychopharmacology: a fourth generation of progress.* Raven Press, New York, pp. 75-85.
- Crews, F.T., Lawrimore, C.J., Walter, T.J., Coleman Jr, L.G., 2017. The role of neuroimmune signaling in alcoholism. *Neuropharmacology.* 122, 56-73.
- Crews, F., Nixon, K., Kim, D., Joseph, J., Shukitt-Hale, B., Qin, L., Zou, J., 2006. BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcoholism, clinical and experimental research.* 30, 1938-1949.
- Crews, F.T., Zou, J., Qin, L., 2011. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun.* 25(Suppl 1), S4-S12.
- Cull-Candy, S., Kelly, L., Farrant, M., 2006. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16(3), 288-297.
- Cull-Candy, S.G., Leszkiewicz, D.N., 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE.* 2004(255), re16.
- Cunningham, C.L., Noble, D., 1992. Conditioned activation induced by ethanol: role in sensitization and conditioned place preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43, 307-313.
- Damsma, G., Pfaus, J.G., Wenkstern, D., Phillips, A.G., Fibiger, H.C., 1992. Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behav. Neurosci.* 106, 181-91.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65(1), 1-105.
- Danbolt, N.C., Furness, D.N., Zhou, Y., 2016. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochem. Int.* 98, 29-45.
- Danysz, W., Parsons, C.G., 1998. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol. Rev.* 80: 598-659.
- Das, S.C., Yamamoto, B.K., Hristov, A.M., Sari, Y., 2015. Ceftriaxone attenuates ethanol drinking and restores extracellular glutamate concentration through normalization of GLT-1 in nucleus accumbens of male alcohol-preferring rats. *Neuropharmacology.* 97, 67-74.

- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., Gan, W.B., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752-758.
- De, A., Krueger, J.M., Simasko, S.M., 2005. Glutamate induces the expression and release of tumor necrosis factor- α in cultured hypothalamic cells. *Brain Res.* 1053, 54-61.
- De Kloet, E.R., 1992. Corticosteroids, stress, and aging. *Front. Neuroendocrinol.* 12, 95-164.
- Delpech, J.-C., Saucisse, N., Parkes, S.L., Lacabanne, C., Aubert, A., Casenave, F., Nadjar, A., 2015. Microglial activation enhances associative taste memory through purinergic modulation of glutamatergic neurotransmission. *J. Neurosci.* 35(7), 3022-3033.
- Deminiere, J.M., Piazza, P.V., Le Moal, M., Simon, H., 1989. Experimental approach to individual vulnerability to psychostimulant addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 13, 141-147.
- Depino, A., Earl, C., Kaczmarczyk, E., Ferrari, C., Besedovsky, H., Del Rey, A., Pitossi, F.J., Oertel, W.H., 2003. Microglial activation with atypical pro-inflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2731-2742.
- Deroche, V., Marinelli, M., Maccari, S., Le Moal, M., Simon, H., Piazza, P.V., 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, 7181-7188.
- 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., Imperato, A., 1998. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system on freely moving rats. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A.* 85, 14, 5274-5278.
- Di Chiara, G., Acquas, E., Tanda, G., Cadoni, C., 1993a. Drugs of abuse: biochemical surrogates of specific aspects of natural reward? *Biochem. Soc. Symp.* 59, 65-81.
- Di Chiara, G., Tanda, G., Frau, R., Carboni, E., 1993b. On the preferential release of dopamine in the nucleus accumbens by amphetamine: further evidence obtained by vertically implanted concentric dialysis probes. *Psychopharmacology.* 112, 398-402.
- Di Ciano, P., Everitt, B.J., 2001. Dissociable effects of antagonism of NMDA and AMPA/KA receptors in the nucleus accumbens core and shell on cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology.* 25, 341-360.
- Di Ciano, P., Cardinal, R.N., Cowell, R.A., Little, S.J., Everitt, B.J., 2001. Differential involvement of NMDA, AMPA/kainate, and dopamine receptors in the nucleus accumbens core in the acquisition and performance of Pavlovian approach behavior. *J. Neurosci.* 21, 9471-9477.
- Diaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragolini, A., Martinez-Palma, L., Cassina, P., Beckman, J., Barbeito, L., 2011. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18126-18131.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7-61.
- Dissing-Olesen, L., LeDue, J.M., Rungta, R.L., Hefendehl, J.K., Choi, H.B., MacVicar, B.A., 2014. Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. *J. Neurosci.* 34, 10511-10527.
- Dityatev, A., Rusakov, D.A., 2011. Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 353-359.
- Dong, Y., Nestler, E.J., 2014. The neural rejuvenation hypothesis of cocaine addiction. *Trends in pharmacological sciences.* 35, 374-383.
- Donzanti, B.A., Yamamoto, B.K., 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.
- Doyle, J.P., Dougherty, J.D., Heiman, M., Schmidt, E.F., Stevens, T.R., Ma, G., Bupp, S., Shrestha, P., Shah, R.D., Doughty, M.L., Gong, S., Greengard, P., Heintz, N., 2008. Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell.* 135, 749-762.
- Dunn, A.J., Berridge, C.W., 1987. Corticotropin-releasing factor administration elicits a stress-like activation of cerebral catechol-aminergic systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 27, 685-691.
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E.M., Black, I.B., 1996. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.* 16, 2508-2521.

- Esparza, M.A., Bollati, F., Garcia-Keller, C., Virgolini, M.B., Lopez, L.M., Brusco, A., Shen, H-W., Kalivas, P.W., Cancela, L.M., 2012. Stress-induced sensitization to cocaine: actin cytoskeleton remodeling within mesocorticolimbic nuclei. *Eur. J. Neurosci.* 36(8), 3103-3117.
- Everitt, B.J., Robbins, T.W., 2005. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat. Neurosci.* 8, 1481-1489.
- Eyo, U., Peng, J., Swiatkowski, P., Mukherjee, A., Bispo, A., Wu, L., 2014. Neuronal Hyperactivity Recruits Microglial Processes via Neuronal NMDA Receptors and Microglial P2Y12 Receptors after Status Epilepticus. *J. Neurosci.* 34(32), 10528-10540.
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375, 599-603.
- Fallon, J.H., Moore, R.Y., 1978. Catecholamine innervation of basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and striatum. *J. Comp. Neurol.* 180, 545-580.
- Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E., 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology.* 28, 138-145.
- Fedoroff, S., 1995. In *Neuroglia* (Kettenmann, H., Ransom, B.R., eds), pp. 162-181, Oxford University Press.
- Ferraguti, F., Shigemoto, R., 2006. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* 326(2), 483-504.
- Ferster, C., Skinner, B., 1957. *Schedules of Reinforcement*. Appleton-Centry-Drofts, New York.
- Fine, S.M., Angel, R.A., Perry, S.W., Epstein, L.G., Rothstein, J.D., Dewhurst, S., Gelbard, H.A., 1996. Tumor necrosis factor alpha inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. *J. Biol. Chem.* 271, 15303-15306.
- Fischer-Smith, K.D., Houston, A.C., Rebec, G.V., 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.
- Flierl, M.A., Rittirsch, D., Nadeau, B.A., Chen, A.J., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., McGuire, S.R., List, R.P., Day, D.E., Hoesel, L.M., Gao, H., Van Rooijen, N., Huber-Lang, M.S., Neubig, R.R., Ward, P.A., 2007. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature.* 449, 721-725.
- Fountainhas, A.M., Wang, M., Liang, K.J., Chen, S., Mettu, P., Damani, M., Fariss, R.N., Li, W., Wong, W.T., 2011. Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One* 6, e15973.
- Fonnum, F., 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42(1), 1-11.
- Foo, L.C., Allen, N.J., Bushong, E.A., Ventura, P.B., Chung, W.-S., Zhou, L., Cahoy, J.D., Daneman, R., Zong, H., Ellisman, M.H., Barres, B.A., 2011. Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron.* 71, 799-811.
- Fouda, A.Y., Newsome, A.S., Spellicy, S., Waller, J.L., Zhi, W., Hess, D.C., y col., 2017. Minocycline in Acute Cerebral Hemorrhage: An Early Phase Randomized Trial. *Stroke* 48(10), 2885-2887.
- Fox, M.E., Figueiredo, A., Menken, M.S., Lobo, M.K., 2020. Dendritic spine density is increased on nucleus accumbens D2 neurons after chronic social defeat. *Sci. Rep.* 10(1), 12393.
- Francesconi, A., Duvoisin, R.M., 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. USA.* 97(11), 6185-6190.
- Frank, M.G., Baratta, M.V., Sprunger, D.B., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2007. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain, Behavior, and Immunity.* 21(1), 47-59.
- Frank, M.G., Thompson, B.M., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2012. Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses. *Brain, Behavior, and Immunity.* 26(2), 337-345.
- Frank, M.G., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2011. Stress- and glucocorticoid-induced priming of neuroinflammatory responses: Potential mechanisms of stress-induced vulnerability to drugs of abuse. *Brain, Behavior, and Immunity.* 25, S21-S28.
- Frank, M.G., Weber, M.D., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2016. Stress-induced neuroinflammatory priming: A liability factor in the etiology of psychiatric disorders. *Neurobiology of Stress.* 4, 62-70.
- Gameiro, A., Braams, S., Rauen, T., Grewer, C., 2011. The discovery of slowness: low- capacity transport and slow anion channel gating by the glutamate transporter EAAT5. *Biophys. J.* 100, 2623-2632.

- García-Keller, C., Kupchik, Y., Gipson, C.D., Brown, R.D., Spencer, S., Bollati, F., Esparza, M.A., Roberts-Wolfe, D.J., Heinsbroek, J.A., Bobadilla, A.-C., Cancela, L.M., Kalivas, P.W., 2016. Glutamatergic mechanisms of comorbidity between acute stress and cocaine Self-administration. *Mol. Psychiatry*. 21(8), 1063-1069.
- García-Keller, C., Martínez, S.A., Esparza, M.A., Bollati, F., Kalivas, P.W., Cancela, L.M., 2013. Cross-sensitization between cocaine and acute restraint stress is associated with sensitized dopamine but not glutamate release in the nucleus accumbens. *Eur. J. Neurosci*. 37(6), 982-995.
- Gerber, U., Gähwiler, B.H., 1994. Modulation of ionic currents by metabotropic glutamate receptors. In *The Metabotropic Glutamate Receptors*, ed. PJ Conn, J Patel, pp. 125-46. Totowa, NJ: Humana.
- Giorgi, O., Piras, G., Lecca, D., Corda, M.G., 2005. Differential activation of dopamine release in the nucleus accumbens core and shell after acute or repeated amphetamine injections: a comparative study in the roman high- and low-avoidance rat lines. *Neuroscience*. 135, 987-998.
- Gipson, C.D., Kupchik, Y.M., Kalivas, P.W., 2014. Rapid, transient synaptic plasticity in addiction. *Neuropharmacology*. 76: 276-86.
- Gipson, C.D., Reissner, K.J., Kupchik, Y.M., Smith, A.C., Stankeviciute, N., Hensley-Simon, M.E., Kalivas, P.W., 2013. Reinstatement of nicotine seeking is mediated by glutamatergic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110, 9124-9129.
- Gjessing, L.R., Gjesdahl, P., Sjaastad, O., 1972. The free amino acids in human cerebrospinal fluid. *J. Neurochem*. 19, 1807-1808.
- Glaum, S.R., Miller, R.J., 1993. Activation of metabotropic glutamate receptors produces reciprocal regulation of ionotropic glutamate and GABA responses in the nucleus of the tractus solitarius of the rat. *J. Neurosci*. 13, 1636-1641.
- Golden, S.A., Russo, S.J., 2012. Mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2, a011957.
- Goldstein, R.Z., Volkow, N.D., 2002. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: Neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am. J. Psychiatry*. 159, 1642-1652.
- Gonçalves, J., Martins, T., Ferreira, R., Milhazes, N., Borges, F., Ribeiro, CF., Malva, J.O., Macedo, T.R., Silva, A.P., 2008. Methamphetamine-induced early increase of IL-6 and TNF- α mRNA expression in the mouse brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1139, 103-111.
- Graeber, M.B., 2010. Changing face of microglia. *Science*. 330, 783-788.
- Graeber, M.B., Streit, W.J., 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 119, 89-105.
- Greger, I.H., Esteban, J.A., 2007. AMPA receptor biogenesis and trafficking. *Curr. Opin. Neurobiol*. 17(3), 289-297.
- Grewer, C., Watzke, N., Wiessner, M., Rauen, T., 2000. Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 9706-9711.
- Griffith, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med*. 27(9-10), 922-935.
- Grippe, A.J., Francis, J., Beltz, T.G., Felder, R.B., Johnson, A.K., 2005. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiology & Behavior*, 84(5), 697-706.
- Groenewegen H.J., Wright C.I., Beuer A.V.J., 1996. The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? In Holstege G, Bandler R, Saper CB, eds. *The emotional motor system*. *Prog. Brain. Res*. 107, 485-511.
- Groenewegen, H.J., Wright, C.I., Beijer, A.V., Voorn, P., 1999. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann. NY. Acad. Sci*. 877, 49-63.
- Gupta, S., Ellis, S.E., Ashar, F.N., Moes, A., Bader, J.S., Zhan, J., West, A.B., Arking, D.E., 2014. Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nat. Commun*. 5, 5748.
- Haber, S.N., 2003. The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J. Chem. Neuroanat*. 26, 317-330.
- Hahn, J., Hopf, F.W., Bonci, A., 2009. Chronic cocaine enhances cortico- tropin-releasing factor-dependent potentiation of excitatory transmission in ventral tegmental area dopamine neurons. *J. Neurosci*. 29, 6535-6544.
- Hains, B.C., Waxman, S.G., 2006. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J. Neurosci*. 26, 4308-4317.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.H., Haydon, P.G., 2007. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J. Neurosci*. 27, 6473-77.

- Halassa, M.M., Haydon, P.G., 2010 Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 335-355.
- Hamberger, A., Nystrom, B., 1984. Extra- and intracellular amino acids in the hippocampus during development of hepatic encephalopathy. *Neurochem. Res.* 9, 1181-1192.
- Hanisch, U.-K., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 40, 140-155.
- Hanisch, U.K., Kettenmann, H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387-1394.
- Harris, K.M., Kater, S.B., 1994. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 341-71.
- Hayashi, Y., Ishibashi, H., Hashimoto, K., Nakanishi, H., 2006. Potentiation of the NMDA receptor-mediated responses through the activation of the glycine site by microglia secreting soluble factors. *Glia.* 53, 660-668.
- Haydon, P.G., 2001. Glia: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(3), 185-93.
- Headley, P.M., Grillner, S., 1990. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol. Sci.* 11(5), 205-211.
- Heimer, L., Alheid, G.F., Zahm, D.S., 1993. Basal forebrain organization: an anatomical framework for motor aspects of drive and motivation, in: P.W. Kalivas and C.D. Barnes Eds., *Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-32.
- Heimer, L., Zham, D.S., Churchill, L., Kalivas, P.W., Wohltmann, C., 1991. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience.* 41, 89-125.
- Henry, D.J., Greene, M.A., White, F.J., 1989. Electrophysiological effects of cocaine in the mesoaccumbens dopamine system: repeated administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251, 833-839.
- Henry, D.J., White, F.J., 1991. Repeated cocaine administration causes persistent enhancement of D1 dopamine receptor sensitivity within the rat nucleus accumbens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258, 882-890.
- Hickey, W.F., Vass, K., Lassmann, H., 1992. Bone marrow-derived elements in the central nervous system: An immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 51, 246-256.
- Hinoi, E., Takarada, T., Ueshima, T., Tsuchihashi, Y., Yoneda, Y., 2004. Glutamate signaling in peripheral tissues. *Eur. J. Biochem.* 271, 1-13.
- Hinwood, M., Morandini, J., Day, T.A., Walker, F.R., 2012a. Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cereb. Cortex.* 22, 1442-1454.
- Hinwood, M., Tynan, R.J., Charnley, J.L., Beynon, S.B., Day, T.A., Walker, F.R., 2012b. Chronic stress induced remodeling of the prefrontal cortex: structural re-organization of microglia and the inhibitory effect of minocycline. *Cereb. Cortex.* 23(8), 1784-97.
- Holmseth, S., Dehnes, Y., Huang, Y.H., Follin-Arbelet, V.V., Grutle, N.J., Mylonakou, M.N., Plachez, C., Zhou, Y., Furness, D.N., Bergles, D.E., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 2012. The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *J. Neurosci.* 32, 6000-6013.
- Holtmaat, A., Svoboda, K., 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 647-658.
- Honig, L.S., Chambliss, D.D., Bigio, E.H., Carroll, S.L., Elliott, J.L., 2000. Glutamate transporter EAAT2 splice variants occur not only in ALS, but also in AD and controls. *Neurology.* 55, 1082-1088.
- Hösli, E., Hösli, L., 1993. Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 40(4), 477-506.
- Hughes, E.G., Maguire, J.L., McMinn, M.T., Scholz, R.E., Sutherland, M.L., 2004. Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking. *Molecular Brain Research.* 124, 114-123.
- Hutchinson, M.R., Bland, S.T., Johnson, K.W., Rice, K.C., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2007. Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *Scientific World Journal*, 7, 98-111.
- Hutchinson, M.R., Northcutt, A.L., Chao, L.W., Kearney, J.J., Zhang, Y., Berkelhammer, D.L., Loram, L.C., Rozeske, R.R., Bland, S.T., Maier, S.F., Gleeson, T.T., Watkins, L.R., 2008. Minocycline suppresses morphine-induced respiratory depression, suppresses morphine-induced reward, and enhances systemic morphine-induced analgesia. *Brain Behav. Immun.* 22, 1248-1256.
- Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J., 2006. Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 565-598.

- Isaac, J.T., Ashby, M.C., McBain, C.J., 2007. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. 54(6), 859-871.
- Ito, R., Dalley, J.W., Howes, S.R., Robbins, T.W., Everitt, B.J., 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, 7489–7495.
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., Kohsaka, S., 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 57, 1-9.
- Ito, R., Robbins, T.W., Everitt, B.J., 2004. Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat. Neurosci.* 7, 389-397.
- Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., Fukuuchi, Y., 2001. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke*. 32, 1208-1215.
- Itzhak, Y., Martin, J.L., 1999. Effects of cocaine, nicotine, dizocipine and alcohol on mice locomotor activity: cocaine-alcohol cross-sensitization involves upregulation of striatal dopamine transporter binding sites. *Brain Res.* 818, 204-211.
- Jaber, M., Robinson, S.W., Missale, C., Caron, M.C., 1996. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35: 1503-1519.
- Javitt, D.C., 2004. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry*. 9, 984-997, 979.
- Jensen, C.J., Massie, A., De Keyser, J., 2013. Immune players in the CNS: the astrocyte. *Journal of neuroimmune pharmacology*. 8, 824-839.
- Jinno, S., Fleischer, F., Eckel, S., Schmidt, V., Kosaka, T., 2007. Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *Glia* 55, 1334-1347.
- Johnson, J.D., O'Connor, K.A., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2004. The role of IL-1 β in stress-induced sensitization of proinflammatory cytokine and corticosterone responses. *Neuroscience*. 127:569–577.
- Jones, E.G., Powell, T.P., 1969. Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *J. Cell Sci.* 5, 509-529.
- Jordán, J., Aguirre, N., Fernández Gómez, F.J., Galindo, M.F., 2006. Minociclina y neuroprotección: luces y sombras. *Actualidad en farmacología y terapéutica*. 4, 260-263.
- Joyce, E.M., Iversen, S.D., 1979. The effect of morphine applied locally to mesencephalic dopamine cell bodies on spontaneous motor activity in the rat. *Neurosci. Lett.* 14, 207-212.
- Jurga, A.M., Paleczna, M., Kuter, K., 2020. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front. Cell. Neurosci.* 14: 198.
- Jursky, F., Nelson, N., 1996. Developmental expression of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in mouse brain. *J. Neurochem.* 67, 336-44.
- Kahlig, K.M., Galli, A., 2003. Regulation of dopamine transporter function and plasma membrane expression by dopamine, amphetamine and cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* 479, 153-158.
- Kalivas, P.W., 1995. Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants. *Drug Alcohol Depend.* 37, 95-100.
- Kalivas, P.W., 2009. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 561-572.
- Kalivas, P.W., Churchill, L., Klitenick, M.A., 1993a. The circuitry mediating the translation of motivational stimuli into adaptive motor responses, in: P.W. Kalivas, C.D. Barnes Eds., *Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 237-287.
- Kalivas, P.W., Duffy, P., 1990. Effect of acute and daily cocaine treatment of extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Synapse*, 5(1), 48-58.
- Kalivas, P.W., Duffy, P., 1995. D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 15, 5379-5388.
- Kalivas, P.W., Duffy, P., 1998. Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area. *J. Neurochem.* 70, 1497–1502.
- Kalivas, P.W., Duffy, P., Dumars, L.A., Skinner, C., 1988. Behavioral and neurochemical effects of acute and daily cocaine administration in rats. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 245, 485-492.
- Kalivas, P.W., Hooks, M.S., Sorg, B., 1993b. The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav. Pharmacol.* 4, 315-334.

- Kalivas, P.W., McFarland, K., Bowers, S., Szumlinski, K., Xi, Z.X., Baker, D., 2003. Glutamate transmission and addiction to cocaine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1003, 169-75.
- Kalivas, P.W., Stewart, J., 1991. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res. Rev.* 16, 223-244.
- Kalivas, P.W., Volkow, N.D., 2005. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry.* 162, 1403-1413.
- Kalivas, P.W., Weber, B., 1988. Amphetamine injection into the ventral mesencephalon sensitizes rats to peripheral amphetamine and cocaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245, 1095-1102.
- Kanai, Y., Hediger, M.A., 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360, 467-471.
- Kanai, Y., Hediger, M.A., 2004. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflügers Arch.* 447, 469-479.
- Kanai, Y., Stelzner, M., Nussberger, S., Khawaja, S., Hebert, S.C., Smith, C.P., Hediger, M.A., 1994. The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter - insights into structure and mechanism of transport. *J. Biol. Chem.* 269, 20599-20606.
- Kaneko, M., Stellwagen, D., Malenka, R.C., Stryker, M.P., 2008. Tumor necrosis factor- α mediates one component of competitive, experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Neuron.* 58, 673-680.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., Noguchi, J., 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 33, 121-129.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., Nakahara, H., 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in neurosciences.* 26, 360-368.
- Keck, T., Mrcic-Flogel, T.D., Vaz Afonso, M., Eysel, U.T., Bonhoeffer, T., Hubener, M., 2008. Massive restructuring of neuronal circuits during functional reorganization of adult visual cortex. *Nat. Neurosci.* 11, 1162-1167.
- Kelley, A.E., 2004a. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron.* 44, 161-179.
- Kelley, A.E., 2004b. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 765-776.
- Kempermann, G., Neumann, H., 2003. Neuroscience. Microglia: the enemy within? *Science.* 302, 1689-1690.
- Kettenmann, H., 2007. Neuroscience: the brain's garbage men. *Nature.* 446, 987-989.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., Verkhratsky, A., 2011. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.*, 91, 461-553.
- Kew, J.N., Kemp, J.A., 2005. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl).* 179, 4-29.
- Kierdorf, K., Prinz, M., 2013. Factors regulating microglia activation. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 44.
- Kim, J., Park, B.H., Lee, J.H., Park, S.K., Kim, J.H., 2011. Cell type-specific alterations in the nucleus accumbens by repeated exposures to cocaine. *Biol. Psychiatry.* 69, 1026-1034.
- Kippin, T.E., Szumlinski, K.K., Kaposova, Z., Reznier, B., See, R.E., 2008. Prenatal stress enhances responsiveness to cocaine. *Neuropsychopharmacology.* 33, 769-782.
- Klößner, U., Storck, T., Conradt, M., Stoffel, W., 1993. Electrogenic L-glutamate uptake in *Xenopus laevis* oocytes expressing a cloned rat brain L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST-1). *J. Biol. Chem.* 268, 14594-14596.
- Knackstedt, L.A., Melendez, R.I., Kalivas, P.W., 2010. Ceftriaxone restores glutamate homeostasis and prevents relapse to cocaine seeking. *Biol. Psychiatry.* 67(1), 81-84.
- Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Kadomatsu, K., 2013. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death & Disease.* 4(3), e525.
- Koch, H.P., Brown, R.L., Larsson, H.P., 2007. The glutamate-activated anion conductance in excitatory amino acid transporters is gated independently by the individual subunits. *J. Neurosci.* 27, 2943-2947.
- Koh, I.Y., Lindquist, W.B., Zito, K., Nimchinsky, E.A., Svoboda, K., 2002. An image analysis algorithm for dendritic spines. *Neural computation.* 14, 1283-1310.
- Kõiv, K., Vares, M., Kroon, C., Metelitsa, M., Tiitsaar, K., Laugus, K., Jaako, K., Harro, J., 2019. Effect of chronic variable stress on sensitization to amphetamine in high and low sucrose-consuming rats. *J. Psychopharmacol.* 1-12.
- Koob, G.F., 2004. Allostatic view of motivation: Implications for psychopathology. *Nebr. Symp. Motiv.* 50, 1-18.

- Koob, G.F., 1999. Stress, corticotropin-releasing factor, and drug addiction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 897, 27-45.
- Koob, G.F., Bloom, F.E., 1988. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242(4879), 715-723.
- Koob, G.F., Caine, B., Markou, A., Pulvirenti, L., Weiss, F., 1994. Role of mesocortical dopamine system in the motivating effects of cocaine. *NIDA Research Monograph*. 145, 1-18.
- Koob, G.F., Heinrichs, S.C., 1999. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res.* 848, 141-152.
- Koob, G.F., Le Moal, M., 1997. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*. 278(5335), 52-8.
- Koob, G.F., Le Moal, M., 2008. Addiction and the brain antireward system. *Annu. Rev. Psychol.* 59, 29-53.
- Koob, G.F., Nestler, E.J., 1997. The neurobiology of drug addiction. *J. Neuropsychiatry. Clin. Neurosci.* 9(3), 482-97.
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2010. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 35(1), 217-38.
- Koob, G.F., Zorrilla, E.P., 2010. Neurobiological mechanisms of addiction: focus on corticotropin-releasing factor. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 11, 63-71.
- Kopec, C.D., Li, B., Wei, W., Boehm, J., Malinow, R., 2006. Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J. Neurosci.* 26, 2000-2009.
- Kourrich, S., Rothwell, P.E., Klug, J.R., Thomas, M.J., 2007. Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 27, 7921-7928.
- Kreek, M.J., Nielsen, D.A., Butelman, E.R., LaForge, K.S., 2005. Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat. Neurosci.* 8, 11, 1450-7.
- Kreisel, T., Frank, M.G., Licht, T., Reshef, R., Ben-Menachem-Zidon, O., Baratta, M.V., Yirmiya, R., 2013. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Molecular Psychiatry*, 19(6), 699-709.
- Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.*, 19, 312-318.
- Kvamme, E., Torgner, I.A., Svenneby, G., 1985. Glutaminase from mammalian tissues. *Methods Enzymol.* 113, 241-256.
- Lacagnina, M.J., Rivera, P.D., Bilbo, S.D., 2016. Glial and neuroimmune mechanisms as critical modulators of drug use and abuse. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 156-177.
- Lau, L.T., Yu, A.C., 2001. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *J Neurotrauma*. 18(3), 351-359.
- Le Moal, M., Simon, H., 1991. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulator roles. *Physiol. Rev.* 71, 155-234.
- Lee, K.W., Kim, Y., Kim, A.M., Helmin, K., Nairn, A.C., Greengard, P., 2006. Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 3399-3404.
- Lee, S.G., Su, Z.Z., Emdad, L., Gupta, P., Sarkar, D., Borjabad, A., Volsky, D.J., Fisher, P.B., 2008. Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J. Biol. Chem.* 283, 13116-13123.
- Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 1998. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J. Neurosci.* 18, 8751-8757.
- Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 15, 1835-1853.
- Lesage, A., Steckler, T., 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, 357-362.
- Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., Udenfriend, S., 1965. Elucidation of the Rate-Limiting Step in Norepinephrine Biosynthesis in the Perfused Guinea-Pig Heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 148, 1-8.
- Levy, L.M., Warr, O., Attwell, D., 1998. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J. Neurosci.* 18, 9620-9628.

- Lewitus, G.M., Konefal, S.C., Greenhalgh, A.D., Pribiag, H., Augereau, K., Stellwagen, D., 2016. Microglial TNF- α suppresses cocaine-induced plasticity and behavioral sensitization. *Neuron*, 90(3), 483–491.
- Liang, J., Takeuchi, H., Doi, Y., Kawanokuchi, J., Sonobe, Y., Jin, S., Yawata, I., Li, H., Yasuoka, S., Mizuno, T., Suzumura, A., 2008. Excitatory amino acid transporter expression by astrocytes is neuroprotective against microglial excitotoxicity. *Brain Res.* 1210, 11-19.
- Liao, K., Guo, M., Niu, F., Yang, L., Callen, S.E., Buch, S., 2016. Cocaine-mediated induction of microglial activation involves the ER stress-TLR2 axis. *J. Neuroinflammation*. 13, 33.
- Lin, C.L., Tzingounis, A.V., Jin, L., Furuta, A., Kavanaugh, M.P., Rothstein, J.D., 1998. Molecular cloning and expression of the rat EAAT4 glutamate transporter subtype. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 63, 174-179.
- Ling, A.E., Wong, W.C., 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*. 7(1), 9-18.
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79, 1431-1568.
- Lisman, J., Raghavachari, S., 2006. A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses. *Sci. STKE*. 2006(356), re11.
- Little, K.Y., Ramssen, E., Welchko, R., Volberg, V., Roland, C.J., Cassin, B., 2009. Decreased brain dopamine cell numbers in human cocaine users. *Psychiatry Res.* 168, 173-180.
- Liu, Y., Edwards, R.H., 1997. The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 125-156.
- Liu, H., Leak, R.K., Hu, X., 2016. Neurotransmitter receptors on microglia. *Stroke and Vascular Neurology*. 1:e000012.
- Liu, W., Tang, Y., Feng, J., 2011. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci.* 89(5-6), 141-6.
- Liu, S.J., Zukin, R.S., 2007. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci.* 30(3), 126-134.
- Lo Iacono, L., Catale, C., Martini, A., Valzania, A., Viscomi, M.T., Chiurchiù, V., Guatteo, E., Bussone, S., Perrone, F., Di Sabato, P., Aricò, E., D'Argenio, A., Troisi, A., Mercuri, N.B., Maccarrone, M., Puglisi-Allegra, S., Casella, P., Carola, V., 2018. From traumatic childhood to cocaine abuse: the critical function of the immune system. *Biol Psychiatry*. 84(12), 905-916.
- Lu, L., Shepard, J.D., Hall, F.S., Shaham, Y., 2003. Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27(5), 457-491.
- Lucas, S.-M., Rothwell, N.J., Rosemary, M.G., 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British Journal of Pharmacology*. 147, S232-S240.
- Luján, R., Nusser, Z., Roberts, J.D.B., Shigemoto, R., Somogyi, P., 1996. Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1488-1500.
- Luján, R., Roberts, J.D.B., Shigemoto, R., Ohishi, H., Somogyi, P., 1997. Differential plasma distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 α , mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J. Comp. Neuroanat.* 13, 219-241.
- Lynch, M.A., 2009. The multifaceted profile of activated microglia. *Mol. Neurobiol.* 40, 139-156.
- Madayag, A., Lobner, D., Kau, K.S., Mantsch, J.R., Abdulhameed, O., Hearing, M., Grier, M.D., Baker, D.A., 2007. Repeated N-acetylcysteine administration alters plasticity-dependent effects of cocaine. *J. Neurosci.* 27, 13968-13976.
- Madrugal, J.L., Hurtado, O., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., Boscá, L., Leza, J.C., 2002. The increase in TNF- α levels is implicated in NF- κ B activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology*. 26: 155-63.
- Magistretti, P.J., 2006. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J. Exp. Biol.* 209, 2304-11.
- Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., Gris, D., 2019. Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release. *Cells*. 8, 184.
- Malarkey, E.B., Parpura, V., 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem. Int.* 52, 142-154.
- Maldonado-Irizarry C.S., Swanson C.J., Kelley A.E., 1995. Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. *J. Neurosci.* 15, 6779-88.
- Malenka, R.C., Nicoll, R.A., 1993. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci.* 16, 521-527.

- Malherbe, P., Kratzeisen, C., Lundstrom, K., Richards, J.G., Faull, R.L., Mutel, V., 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., Malenka, R.C., 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103-126.
- Mameli, M., Balland, B., Luján, R., Lüscher, C., 2007. Rapid synthesis and synaptic insertion of GluR2 for mGluR-LTD in the ventral tegmental area. *Science.* 317, 530-533.
- Mano, I., Teichberg, V.I., 1998. A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex. *Neuroreport.* 9(2), 327-331.
- Marinelli, M., Le Moal, M., Piazza, P.V., 1998. Sensitization to the motor effects of contingent infusions of heroin but not of kappa agonist RU 51599. *Psychopharmacology.* 139, 281-285.
- Mark, G.P., Blander, D.S., Hoebel, B.G., 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., Weiss, F., Gold, L.H., Caine, S.B., Schulteis, G., Koob, G.K., 1993. Animal models of drug craving. *Psychopharmacology.* 112, 163-182.
- Martin, M., Chen, B.T., Hopf, F.W., Bowers, M.S., Bonci, A., 2006. Cocaine self-administration selectively abolishes LTD in the core of the nucleus accumbens. *Nature neuroscience.* 9, 868-869.
- Matsumoto, Y., Ohmori, K., Fujiwara, M., 1992. Microglia and astroglial reactions to inflammatory lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 37(1-2), 23-33.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., Kasai, H., 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 1086-1092.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., Kasai, H., 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature.* 429, 761-766.
- Mattson, B.J., Koya, E., Simmons, D.E., Mitchell, T.B., Berkow, A., Crombag, H.S., Hope, B.T., 2008. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *Eur. J. Neurosci.* 27, 202-212.
- Matute, C., 2011. Glutamate and ATP signalling in white matter pathology. *J. Anat.* 219, 53-64.
- Mayhew, J., Beart, P.M., Walker, F.R., 2015. Astrocyte and microglial control of glutamatergic signalling: a primer on understanding the disruptive role of chronic stress. *Journal of Neuroendocrinology.* 27, 498-506.
- McBean, G.J., 2002. Cerebral cystine uptake: A tale of two transporters. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 299-302.
- McEwen, B.S., De Kloet, E.R., Rostène, W., 1986. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol. Rev.* 66, 1221-1188.
- McDaid, J., Dallimore, J.E., Mackie, A.R., Mickiewicz, A.L., Napier, T.C., 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., Davidge, S.B., Lapish, C.C., Kalivas, P.W., 2004. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *J. Neurosci.* 24(7), 1551-1560.
- McFarland, K., Lapish, C.C., Kalivas, P.W., 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.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 1995. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* 21, 195-218.
- McGrath, A.G., Briand, L.A., 2019. A potential role for microglia in stress- and drug-induced plasticity in the nucleus accumbens: A mechanism for stress-induced vulnerability to substance use disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 107, 360-369.
- Meinhardt, M.W., Hansson, A.C., Perreau-Lenz, S., Bauder-Wenz, C., Stahlin, O., Heilig, M., y col., 2013. Rescue of infralimbic mGluR2 deficit restores control over drug-seeking behavior in alcohol dependence. *J. Neurosci.* 33(7), 2794-806.
- Meissner, A., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Jaffe, D.B., Gnirke, A., Jaenisch, R., Lander, E.S., 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature.* 454, 766-770.
- Melendez, R.I., Hicks, M.P., Cagle, S.S., Kalivas, P.W., 2005. Ethanol exposure decreases glutamate uptake in the nucleus accumbens. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29, 326-333.
- Meldrum, B.S., 1994. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology.* 44, S14-S23.

- Meredith, G.E., Agolia, R., Arts, M., Groenewegen, H.J., Zham, D.S., 1992. Morphological differences between projection neurons of the core and shell in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience*. 50, 149-62.
- Meredith, G.E., Baldo, B.A., Andrezjewski, M.E., Kelley, A.E., 2008. The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. *Brain Struct. Funct.* 213, 17-27.
- Metz, L.M., Li, D., Traboulsee, A.L., Duquette, P., Eliasziw, M., Cerchiaro, G., y col., 2017. Trial of Minocycline in a Clinically Isolated Syndrome of Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 376(22), 2122-2133.
- Middeldorp, J., Hol, E.M., 2011. GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* 93, 421-443.
- Miller, A.H., Raison, C.L., 2016. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature reviews. Immunology.* 16, 22-34.
- Milligan, E.D., Watkins, L.R., 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10(1), 23-36.
- Mineff, E., Valtchanoff, J., 1999. Metabotropic glutamate receptors 2 and 3 expressed by astrocytes in rat ventrobasal thalamus. *Neurosci. Lett.* 270, 95-98.
- Minelli, A., Barbaresi, P., Reimer, R.J., Edwards, R.H., Conti, F., 2001. The glial glutamate transporter GLT-1 is localized both in the vicinity of and at distance from axon terminals in the rat cerebral cortex. *Neuroscience.* 108(1), 51-59.
- Mitani, A., Tanaka, K., 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.
- Mogenson, G.J., 1987. Limbic-motor integration, in: A.N. Epstein and A.R. Morrison Eds., *Progress in Psychobiology and Physiological Psychology*, Academic Press, New York, 1987, pp. 117-170.
- Mogenson, G.J., Brudzynski, S.M., Wu, M., Yang, C.R., Yim, C.C.Y., 1993. From motivation to action: a review of dopaminergic regulation of limbic-nucleus accumbens-pedunculopontine nucleus circuitries involved in limbic-motor integration, in: P.W. Kalivas, C.D. Barnes Eds., *Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 193-236.
- Mogenson G.J., Jones D.L., Yim C.Y., 1980. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog. Psychobiol.* 14, 607-97.
- Mogenson, G.J., Swanson, L.W., Wu, M., 1985. Evidence that projections from the substantia innominata to zona incertal and mesencephalic locomotor region contribute to locomotor activity. *Brain Res.* 334, 65-76.
- Moghaddam, B., 1993. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J. Neurochem.* 60, 1650-1657.
- Moghaddam, B., 2002. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol. Psychiatry.* 51, 775-787.
- Moghaddam, B., Bolinao, M.L., Steinbehrens, B., Sapolsky, R., 1994. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res.* 655, 251-254.
- Montoya, I.D., Covarrubias, L.D., Patek, J.A., and Graves, J.A., 2003. Posttraumatic stress disorder among Hispanic and African-American drug users. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 29, 729-741.
- Moran, M.M., McFarland, K., Melendez, R.I., Kalivas, P.W., Seamans, J.K., 2005. Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking. *J. Neurosci.* 25, 6389-6393.
- Morrison, H.W., Filosa, J.A., 2013. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J. Neuroinflammation.* 10, 4.
- Moussawi, K., Kalivas, P.W., 2010. Group II metabotropic glutamate receptors (mGluR2/3) in drug addiction. *Eur. J. Pharmacol.* 639, 115-122.
- Moussawi, K., Riegel, A., Nair, S., Kalivas, P.W., 2011a. Extracellular glutamate: functional compartments operate in different concentration ranges. *Front. Syst. Neurosci.* 5, 94.
- Moussawi, K., Zhou, W., Shen, H., Reichel, C.M., See, R.E., Carr, D.B., y col. 2001b. Reversing cocaine-induced synaptic potentiation provides enduring protection from relapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(1), 385-90.
- Murray, J.E., Lacoste, J., Belin, D., 2012. N-Acetylcysteine as a treatment for addiction. In: Belin, DD., editor. *Addictions—from pathophysiology to treatment*. Rijeka, Croatia: InTech. p. 355-80.
- Murugan, M., Ling, E-A., Kaur, C., 2013. Glutamate receptors in microglia. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets.* 12, 773-784.
- Müller, D.J., Likhodi, O., Heinz, A., 2010. Neural markers of genetic vulnerability to drug addiction. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 3, 277-99.

- Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfriend, S., 1964. Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 239, 2910-2917.
- Nair, A., Bonneau, R.H., 2006. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *J. Neuroimmunology.* 171, 72-85.
- Nakagawa, T., Otsubo, Y., Yatani, Y., Shirakawa, H., Kaneko, S., 2008. Mechanisms of substrate transport-induced clustering of a glial glutamate transporter GLT-1 in astroglial-neuronal cultures. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1719-1730.
- Nakanishi, S., 1994. Metabotropic glutamate receptors: Synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron.* 13, 1031-1037.
- Namba, M.D., Kupchik, Y.M., Spencer, S.M., Garcia-Keller, C., Goenaga, J.G., Powell, G.L., Vicino, I.A., Hogue, I.B., Gipson, C.D., 2019. Accumbens neuroimmune signaling and dysregulation of astrocytic glutamate transport underlie conditioned nicotine-seeking behavior. *Addiction Biology.* e12797.
- Nelson, N., 1998. The family of NA⁺/Cl⁻ neurotransmitter transporters. *J. Neurochem.* 71, 1785-1803.
- Nelson, P.T., Soma, L.A., Lavi, E., 2002. Microglia in diseases of the central nervous system. *Ann. Med.* 34, 491-500.
- Nestler, E.J., 1992. Molecular mechanisms of drug addiction. *J. Neurosci.* 12(7), 2439-2450.
- Nestler, E.J., 1997. Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 713-719.
- Nestler, E.J., 2001. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 2, 119-28.
- Nestler, E.J., 2004. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* 25(4), 210-8.
- Nestler, E.J., 2005. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat. Neurosci.* 8, 1445-1449.
- Nestler, E.J., Lüscher, C., 2019. The molecular basis of drug addiction: linking epigenetic to synaptic and circuit mechanisms. *Neuron.* 102, 1, 48-59.
- Newpher, T.M., Ehlers, M.D., 2008. Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron.* 58(4), 472-497.
- Niciu, M.J., Henter, I.D., Sanacora, G., Zarate, C.A. Jr., 2014. Glial abnormalities in substance use disorders and depression: Does shared glutamatergic dysfunction contribute to comorbidity? *World J. Biol. Psychiatry.* 15, 2-16.
- Noda, M., Nakanishi, H., Nabekura, J., Akaike, N., 2000. AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J. Neurosci.* 20(1), 251-258.
- Nordquist, R.E., Vanderschuren, L.J.M.J., Jonker, A.J., Bergsma, M., de Vries, T.J., Pennartz, C.M.A., Voorn, P., 2008. Expression of amphetamine sensitization is associated with recruitment of a reactive neuronal population in the nucleus accumbens core. *Psychopharmacology.* 198, 113-126.
- Northcutt, A.L., Hutchinson, M.R., Wang, X., Baratta, M.V., Hiranita, T., Cochran, T.A., Pomrenze, M.B., Galer, E.L., Kopajtic, T.A., Li, C.M., Amat, J., Larson, G., Cooper, D.C., Huang, Y., O'Neill, C.E., Yin, H., Zahniser, N.R., Katz, J.L., Rice, K.C., Maier, S.F., Bachtell, R.K., Watkins, L.R., 2015. DAT isn't all that: cocaine reward and reinforcement require Toll-like receptor 4 signaling. *Mol. Psychiatry.* 20, 1525-1537.
- Nusser, Z., Mulvihill, E., Streit, P., Somogyi, P., 1994. Subsynaptic segregation of metabotropic and ionotropic glutamate receptors as revealed by immunogold localization. *Neuroscience* 61, 421-427.
- O'Brien, C.P., Ehrman, R. N., Terns, J.N., 1986. Behavioral analysis of drug dependence (Goldeberg, S.R. y Stolerman, I.P., eds), p. 329, Academic Press.
- Okabe, S., 2007. Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol. Cell. Neurosci.* 34(4), 503-518.
- Orr, A.G., Orr, A.L., Li, X.J., Gross, R.E., Traynelis, S.F., 2009. Adenosine A (2A) receptor mediates microglial process retraction. *Nat. Neurosci.* 12, 872-878.
- Ohishi, H., Shigemoto, R., Nakanishi, S., Mizuno, N., 1993. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR3) in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 335, 252-266.
- Ottersen, O.P., Landsend, A.S., 1997. Organization of glutamate receptors at the synapse. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2219-2224.
- Ottersen, O.P. Storm-Mathisen, J., 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., Coolhart, D., Schum Funderburk, J., Wade, M., Brown, P.J., 2007. Precipitants of first substance use in recently abstinent substance use disorder patients with PTSD. *Addictive behaviors.* 32(8), 1719-27.

- Pacchioni, A.M., Cador, M., Bregonzio, C., Cancela, L.M., 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, 682-692.
- Pacchioni, A.M., Gioino, G., Assis, A., Cancela, L.M., 2002. A single exposure to restraint stress induces behavioral and neurochemical sensitization to stimulating effects of amphetamine: involvement of NMDA receptors. *Ann. NY. Acad. Sci.* 965, 233-246.
- Pál, B., 2018. Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 75(16), 2917-2949.
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 333(6048), 1456-1458.
- Papouin, T., Ladepeche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.P., Oliet, S.H., 2012. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*. 150(3), 633-646.
- Park, M., Penick, E.C., Edwards, J.G., Kauer, J.A., Ehlers, M.D., 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science*. 305, 1972-1975.
- Park, M., Salgado, J.M., Ostroff, L., Helton, T.D., Robinson, C.G., Harris, K.M., Ehlers, M.D., 2006. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron*. 52, 817-830.
- Parpura, V., Verkhratsky, A., 2013. Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling. *Croat. Med. J.* 53(6), 518-28.
- Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., Bessis, A., 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (4), E197-E205.
- Pascual, M., Blanco, A.M., Cauli, O., Minarro, J., Guerri, C., 2007. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur. J. Neurosci.* 25, 541-550.
- Patneau, D.K., Mayer, M.L., 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., Camp, D.M., Robinson, T.E., 1991. The time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology*. 103, 480-492.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edn. San Academic Press, Diego.
- Pekny, M., Pekna, M., 2014. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological Reviews*. 94, 1077-1098.
- Pendyam, S., Mohan, A., Kalivas, P.W., Nair, S.S., 2009. Computational model of extracellular glutamate in the nucleus accumbens incorporates neuroadaptations by chronic cocaine. *Neuroscience*. 158, 1266-1276.
- Pennartz, C.M., Groenewegen, H.J., Lopes da Silva, F.H., 1994. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Progress in Neurobiology*. 42, 719-761.
- Perea, G., Araque, A., 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. 317, 1083-1086.
- Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421-431.
- Persson, M., Brantefjord, M., Hansson, E., Rönnbäck, L., 2005. Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF-alpha. *Glia*. 51(2), 111-20.
- Persson, M., Rönnbäck, L., 2012. Microglial self-defence mediated through GLT-1 and glutathione. *Amino Acids*. 42, 207-219.
- Petr, G.T., Sun, Y., Frederick, N.M., Zhou, Y., Dhamne, S.C., Hameed, M.Q., Miranda, C., Bedoya, E.A., Fischer, K.D., Armsen, W., Wang, J., Danbolt, N.C., Rotenberg, A., Aoki, C.J., Rosenberg, P.A., 2015. Conditional deletion of the glutamate transporter GLT-1 reveals that astrocytic GLT-1 protects against fatal epilepsy while neuronal GLT-1 contributes significantly to glutamate uptake into synaptosomes. *J. Neurosci.* 35, 5187-5201.
- Petralia, R.S., 2012. Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons. *Scientific World Journal*. 2012, 267120.
- Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Niedzielski, A.S., Wenthold, R.J., 1996. The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience*. 71, 949-976.

- Piani, D., Fontana, A., 1994. Involvement of the cystine transport system Xc⁻ in the macrophage- induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J. Immunol.* 152, 3578-3585.
- Piani, D., Spranger, M., Frei, K., Schaffner, A., Fontana, A., 1992. Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *Eur. J. Immunol.* 22, 2429-2436.
- Piazza, P.V., Deminiere, J.M., Le Moal, M., Simon, H., 1989. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science.* 245, 1511-1513.
- Piazza, P.V., Deminiere, J.M., Le Moal, M., Simon, H., 1990. Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. *Brain Res.* 514(1), 22-26.
- Piazza, P.V., Le Moal, M., 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.
- Piazza, P.V., Le Moal, M., 1998. The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 67-74.
- Pierce, R.C., Bell, K., Duffy, P., Kalivas, P.W., 1996. Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J. Neurosci.* 16, 1550-1560.
- Pierce, R.C., Kalivas, P.W., 1995. Amphetamine produces sensitized increases in locomotion and extracellular dopamine preferentially in the nucleus accumbens shell of rats administered repeated cocaine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 275(2), 1019-1029.
- Pierce, R.C., Kalivas, P.W., 1997a. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res. Rev.* 25(2), 192-216.
- Pierce, R.C., Kalivas, P.W., 1997b. Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. *J. Neurosci.* 17, 9, 3254-3261.
- Pontieri, F.E., Tanda, G., Di Chiara, G., 1995. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(26), 12304-12308.
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., Sanacora, G., 2012. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 22-37.
- Poskanzer, K.E., Yuste, R., 2011. Astrocytic regulation of cortical UP states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(45), 18453-8.
- Post, R., 1980. Intermittent versus continuous stimulation: effect of time interval on the development of sensitization or tolerance. *Life Sciences.* 26, 1275-1282.
- Post, R.M., Contel, N.R., 1983. Human and animal studies of cocaine: implications for development of behavioral pathology, in: CREESE, I. (Ed.) *Stimulants: neurochemical, behavioral and clinical perspectives*, pp. 169-203 (New York, Raven Press).
- Post, R.M., Weiss, S.R., Fontana, D., Pert, A., 1992. "Conditioned sensitization to the psychomotor stimulant cocaine." *Ann. NY Acad. Sci.* 654, 386-399.
- Pow, D.V., 2001. Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to amino acid, a selectively transported substrate. *Glia.* 34, 27-38.
- Prow, N.A., Irani, D.N., 2008. The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta, mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute viral encephalomyelitis. *J. Neurochem.* 105, 1276-1286.
- Pozzo-Miller, L.D., Inoue, T., Murphy, D.D., 1999. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 81, 1404-1411.
- Qin, S., Colin, C., Hinnert, I., Gervais, A., Cheret, C., and Mallat, M., 2006. System Xc⁻ and apolipoprotein E expressed by microglia have opposite effects on the neurotoxicity of amyloid-beta peptide 1-40. *J. Neurosci.* 26, 3345-3356.
- Rao, V.L., Bowen, K.K., Dempsey, R.J., 2001. Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochem. Res.* 26, 497-502.
- Reichel, C.M., Moussawi, K., Do, P.H., Kalivas, P.W., See, R.E., 2011. Chronic N-acetylcysteine during abstinence or extinction after cocaine self-administration produces enduring reductions in drug seeking. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 337(2), 487-93.
- Rappeneau, V., Blaker, A., Petro, J.R., Yamamoto, B.K., Shimamoto, A., 2016. Disruption of the glutamate-glutamine cycle involving astrocytes in an animal model of depression for males and females. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 231.

- Rasmussen, B., Unterwald, E.M., Rawls, S.M., 2011. Glutamate transporter subtype 1 (GLT-1) activator ceftriaxone attenuates amphetamine-induced hyperactivity and behavioral sensitization in rats. *Drug Alcohol Depend.* 118, 484-488.
- Rauen, T., Fischer, F., Wiessner, M., 1999. Glia–neuron interaction by high-affinity glutamate transporters in neurotransmission. *Adv. Exp. Med. Biol.* 468, 81-95.
- Reeves, A.M., Shigetomi, E., Khakh, B.S., 2011. Bulk loading of calcium indicator dyes to study astrocyte physiology: key limitations and improvements using morphological maps. *J. Neurosci.* 31, 9353–9358.
- Reid, M.S., Berger, S.P., 1996. Evidence for sensitization of cocaine- induced nucleus accumbens glutamate release. *NeuroReport.* 7, 1325-1329.
- Reid, M.S., Hsu, K., Berger, S.P., 1997. Cocaine and amphetamine preferentially stimulate glutamate release in the limbic system: studies on the involvement of dopamine. *Synapse* 27, 95–105.
- Reissner, K.J., Gipson, C.D., Tran, P.K., Knackstedt, L.A., Scofield, M.D., Kalivas, P.W., 2015. Glutamate transporter GLT-1 mediates N-acetylcysteine inhibition of cocaine reinstatement. *Addict. Biol.* 20, 316-323.
- Rimmele, T.S., Rosenberg, P.A., 2016. GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochem. Int.* 98, 19-28.
- Ritz, M.C., Lamb, R.J., Goldberg, S.R., Kuhar, M.J., 1987. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science.* 237(4819), 1219-1223.
- Robbins, T.W., Everitt, B.J., 1999. Drug addiction: bad habits add up. *Nature.* 398, 567-570.
- Robbins, T.W., Koob, G.F., 1980. Selective disruption of displacement behavior by lesions of the mesolimbic dopamine system. *Nature.* 285, 409-12.
- Robinson, T.E., 1988. Stimulant drugs and stress: factors influencing individual differences in the susceptibility to sensitization, in: Kalivas, P.W. and Barnes, C. (Eds) *Sensitization of the Nervous System*, pp. 145-173 (Caldwell, N.J, Telford Press).
- Robinson, T.E., Becker, J.B., 1986. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res. Rev.* 11, 157-198.
- Robinson, T.E., Berridge, K.C., 1993. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Rev.* 18, 247-291.
- Robinson, T.E., Berridge, K.C., 2000. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction.* 95(suppl. 2), S91- S118.
- Robinson, T.E., Berridge, K.C., 2001. Incentive-sensitization and addiction. *Addiction.* 96, 103-114.
- Roninson, T.E., Browman, K.E., Crombag, H.S., Badiani, A., 1998. Modulation of the induction or expression of psychostimulant sensitization by the circumstances surrounding drug administration. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 347-354.
- Robinson, T.E., Kolb, B., 1997. Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J. Neurosci.* 17, 8491-8497.
- Robinson, T.E., Kolb, B., 1999. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 1598-1604.
- Robinson, T.E., Kolb, B., 2004. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology.* 47 Suppl, 1, 33-46.
- Robison, A.J., Nestler, E.J., 2011. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 623–637.
- Rosenblat, J.D., McIntyre, R.S., 2018. Efficacy and tolerability of minocycline for depression: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *J Affect Disord.* 227, 219-225.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., Stevens, C.F., 1998. The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science.* 280(5369), 1596-1599.
- Rothstein, J.D., 1995a. Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurosci.* 3, 348-359.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., Kuncl, R.W., 1995b. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38, 73-84.

- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F., 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16(3), 675-686.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., Giaume, C., 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science*. 322, 1551-55.
- Rouge-Pont, F., Marinelli, M., Le Moal, M., Simon, H., Piazza, P.V., 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, 7189-7195.
- Russo, S.J., Dietz, D.M., Dumitriu, D., Morrison, J.H., Malenka, R.C., Nestler, E.J., 2010. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci.* 33, 267-276.
- Saal, D., Dong, Y., Bonci, A., Malenka, R.C., 2003. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron*. 37, 577-582.
- Santello, M., Cali, C., Bezzi, P., 2012. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv. Exp. Med. Biol.* 970, 307-31.
- Santoro, M.R., Bray, S.M., Warren, S.T., 2012. Molecular mechanisms of fragile X syndrome: A twenty-year perspective. *Annu. Rev. Pathol.* 7, 219-245.
- Sari, Y., Smith, K.D., Ali, P.K., Rebec, G.V., 2009. Upregulation of Glt1 attenuates cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *J. Neurosci.* 29(29), 9239-9243.
- Sari, Y., Sreemantula, S.N., 2012. Neuroimmunophilin GPI-1046 reduces ethanol consumption in part through activation of GLT1 in alcohol-preferring rats. *Neuroscience.* 227, 327-335.
- Sasaki, A., 2016. Microglia and brain macrophages: An update. *Neuropathology.* 1-13.
- Sato, M., 1986. Acute exacerbation of metham- phetamine psychosis and lasting dopaminergic supersensitivity - a clinical survey. *Psychopharmacology Bulletin.* 22, 751-756.
- Sato, M., Chen, C.C., Akiyama, K., Otsuki, S., 1983. Acute exacerbation of paranoid psychotic state after long-term abstinence in patients with previous methamphetamine psychosis, *Biol. Psychiatry.* 18, 429-440.
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., Bannai, S., 1999. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 11455-11458.
- Sato, H., Tamba, M., Okuno, S., Sato, K., Keino-Masu, K., Masu, M., Bannai, S., 2002. Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system Xc-, in the mouse brain. *J. Neurosci.* 22, 8028-8033.
- Sawchenko, P.E., Imaki, T., Potter, E., Kovacs, K., Imaki, J., Vale, W., 1993. The functional neuroanatomy of corticotropin-releasing factor. *Ciba Found Symp.* 172, 5-21; discussion 21-29.
- Schmaal, L., Veltman, D.J., Nederveen, A., van den Brink, W., Goudriaan, A.E., 2012. N-acetylcysteine normalizes glutamate levels in cocaine-dependent patients: a randomized crossover magnetic resonance spectroscopy study. *Neuropsychopharmacology.* 37(9), 2143-52.
- Scofield, M.D., Boger, H.A., Smith, R.J., Li, H., Haydon, P.G., Kalivas, P.W., 2015. Gq-DREADD selectively initiates glial glutamate release and inhibits cue-induced cocaine seeking. *Biol. Psychiatry.* 78, 441-451.
- Scofield, M.D., Heinsbroek, J.A., Gipson, C.D., Kupchik, Y.M., Spencer, S., Smith, A.C.W., Roberts-Wolfe, D., Kalivas, P.W., 2016a. The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. *Pharmacological Reviews.* 68, 816-871.
- Scofield, M.D., Kalivas, P.W., 2014. Astrocytic dysfunction and addiction: consequences of impaired glutamate homeostasis. *Neuroscientist.* 20, 610-622.
- Scofield, M.D., Li, H., Siemsen, B.M., Healey, K.L., Tran, P.K., Woronoff, N., Boger, H.A., Kalivas, P.W., Reissner, K.J., 2016b. Cocaine Self-Administration and Extinction Leads to Reduced Glial Fibrillary Acidic Protein Expression and Morphometric Features of Astrocytes in the Nucleus Accumbens Core. *Biol. Psychiatry.* 80(3), 207-15.
- Shepherd, J.D., Huganir, R.L., 2007. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 23, 613-643.
- Sieger, D., Moritz, C., Ziegenhals, T., Prykhozhiy, S., Peri, F., 2012. Long-range Ca²⁺ waves transmit brain-damage signals to microglia. *Dev. Cell.* 22, 1138-1148.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., Stevens, B., 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 74, 691-705.

- Scheyer, A.F., Wolf, M.E., Tseng, K.Y., 2014. A protein synthesis-dependent mechanism sustains calcium-permeable AMPA receptor transmission in nucleus accumbens synapses during withdrawal from cocaine self-administration. *J. Neurosci.* 34(8), 3095-3100.
- Schipke, C.G., Boucsein, C., Ohlemeyer, C., Kirchhoff, F., Kettenmann, H., 2002. Astrocytes Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J.* 16(2), 255-7.
- Schneider, N., Cordeiro, S., Machtens, J.-P., Braams, S., Rauen, T., Fahlke, C., 2014. Functional properties of the retinal glutamate transporters GLT-1c and EAAT5. *J. Biol. Chem.* 289, 1815-1824.
- Schoenen, J., 1982. The dendritic organization of the human spinal cord: the dorsal horn. *Neuroscience.* 7, 2057-2087.
- Schousboe, A., 2000. Pharmacological and functional characterization of astrocytic GABA transport: a short review. *Neurochem. Res.* 25, 1241-44.
- Schultz, W., Apicella, P., Scarnati, E., Ljungberg, T., 1992. Neuronal activity in monkey ventral striatum related to the expectation of reward. *J. Neurosci.* 12, 4595-4606.
- Schuster, C.R., Thompson, T., 1969. Self administration of and behavioral dependence on drugs. *Annu. Rev. Pharmacol.* 9, 483-502.
- Schwartz, M., Butovsky, O., Bruck, W., Hanisch, U.K., 2006. Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci.* 29, 68-74.
- Seal, K.H., Bertenthal, D., Miner, C.R., Sen, S., Marmar, C., 2007. Bringing the war back home: mental health disorders among 103,788 US veterans returning from Iraq and Afghanistan seen at Department of Veterans Affairs facilities. *Archives of internal medicine,* 167(5), 476-82.
- Seal, K.H., Metzler, T.J., Gima, K.S., Bertenthal, D., Maguen, S., Marmar, C.R., 2009. Trends and risk factors for mental health diagnoses among Iraq and Afghanistan veterans using Department of Veterans Affairs health care, 2002-2008. *American journal of public health.* 99(9), 1651-8.
- Seal, R.P., Amara, S.G., 1999. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 431-456.
- SEDRONAR, Argentina, 2017. Consumo de cocaína: estudio nacional en población de 12 a 65 años sobre consumo de sustancias psicoactivas.
- Seeman, P., van Tol, H.H.M., 1994. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 264-270.
- Segal, D.S., Schuckit, M.A., 1983. Animal models of stimulant-induced psychosis, in: Creese, I. (Ed.) *Stimulants: neurochemical, behavioral and clinical perspectives.* pp. 131-167 (New York, Raven Press).
- Sekar, A., Bialas, A.R., de Rivera, H., Davis, A., Hammond, T.R., Kamitaki, N., y col., 2016. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530, 177-183.
- Sekine, Y., Ouchi, Y., Sugihara, G., Takei, N., Yoshikawa, E., Nakamura, K., 2008. Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers. *J. Neurosci.* 28, 5756-5761.
- Sellings, L.H., Clarke, P.B., 2003. Segregation of amphetamine reward and locomotor stimulation between nucleus accumbens medial shell and core. *J. Neurosci.* 23, 6295-6303.
- Sesack, S.R., Deutch, A.Y., Roth, R.H., Bunney, B.S., 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., Pickel, V.M., 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, 266-279.
- Sesack, S.R., Pickel, V.M., 1992. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.* 320, 145-160.
- Shaham, Y., Erb, S., and Stewart, J., 2000. Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. *Brain. Res. Rev.* 33, 13-33.
- Shaked, I., Tchoresh, D., Gersner, R., Meiri, G., Mordechai, S., Xiao, X., Hart, R.P., Schwartz, M., 2005. Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators. *J. Neurochem.* 92, 997-1009.
- Sharma, M.K., Mansur, D.B., Reifensberger, G., Perry, A., Leonard, J.R., Aldape, K.D., Albin, M.G., Emnett, R.J., Loeser, S., Watson, M.A., Nagarajan, R., Gutmann, D.H., 2007. Distinct genetic signatures among pilocytic astrocytomas relate to their brain region origin. *Cancer Res.* 67, 890-900.

- Shen, H., Moussawi, K., Zhou, W., Toda, S., Kalivas, P.W., 2011. Heroin relapse requires long-term potentiation-like plasticity mediated by NMDA2b-containing receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(48), 19407-19412.
- Shen, H., Scofield, M.D., Boger, H., Hensley, M., Kalivas, P.W., 2014. Synaptic glutamate spillover due to impaired glutamate uptake mediates heroin relapse. *J. Neurosci.* 34, 16, 5649–5657.
- Shen, H., Toda, S., Moussawi, K., Bouknight, A., Zahm, D.S., Kalivas, P.W., 2009. Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. *J. Neurosci.* 29, 2876-2884.
- Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P.J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S., Mizuno, N., 1997. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 7503-7522.
- Shippenberg, T.S., LeFevour, A., Thompson, A.C., 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.
- Shuster, L., Yu, G., Bates, A., 1977. Sensitization to cocaine stimulation in mice, *Psychopharmacology.* 5, 185-190.
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q.S., Nedergaard, M., 2003. Signaling at the gliovascular interface. *J. Neurosci.* 23, 9254-62.
- Sinha, R., 2009. Stress and addiction: a dynamic interplay of genes, environment, and drug intake. *Biol Psychiatry.* 66, 100-101.
- Sinha, R., Garcia, M., Paliwal, P., Kreek, M.J., Rounsaville, B.J., 2006. Stress-induced cocaine craving and hypothalamic–pituitary–adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Arch. Gen. Psychiatry.* 63, 324-331.
- Sitcheran, R., Gupta, P., Fisher, P.B., Baldwin, A.S., 2005. Positive and negative regulation of EAAT2 by NF-kappaB: a role for N-myc in TNFalpha-controlled repression. *EMBO J.* 24, 510-520.
- Small, D.L., Morley, P., Buchan, A.M., 1999. Biology of ischemic cerebral cell death. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 42, 185-207.
- Smith, A.D., Justice, J.B., 1994. The effect of inhibition of synthesis, release, metabolism and uptake on the microdialysis extraction fraction of dopamine. *J. Neurosci. Meth.* 54, 75-82.
- Smith, J.A., Mo, Q., Guo, H., Kunko, P.M., Robinson, S.E., 1995. Cocaine increases extraneuronal levels of aspartate and glutamate in the nucleus accumbens. *Brain Research.* 264-269.
- Snider, S.E., Hendrick, E.S., Beardsley, P.M., 2013. Glial cell modulators attenuate methamphetamine selfadministration in the rat. *Eur J Pharmacol.* 701, 124-30.
- Sondheimer, I., Knackstedt, L.A., 2011. Ceftriaxone prevents the induction of cocaine sensitization and produces enduring attenuation of cue- and cocaine-primed reinstatement of cocaine-seeking. *Behav. Brain Res.* 225, 252-258.
- Sorg, B.A., Kalivas, P.W., 1991. Effects of cocaine and footshock stress on extracellular dopamine levels in the ventral striatum. *Brain Research.* 559, 29-36.
- Sorg, O., Magistretti, P.J., 1991. Characterization of the glycogenolysis elicited by vasoactive intestinal peptide, noradrenaline and adenosine in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Brain Res.* 563, 227-33.
- Spampinato, S.F., Copani, A., Nicoletti, F., Sortino, M.A., Caraci, F., 2018. Metabotropic glutamate receptors in glial cells: a new potential target for neuroprotection? *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 11, 1-13.
- Spanagel, R., Weiss, F., 1999. The dopamine hypothesis of reward: past and present status. *Trends. Neurosci.* 22, 521-7.
- Spanagel, R., 2017. Animal models of addiction. *Dialogues Clin Neurosci.* 19(3), 247-258.
- Spencer, S., García-Keller, C., Roberts-Wolfe, D., Heinsbroek, J.A., Mulvaney, M., Sorrell, A., Kalivas, P.W., 2017. Cocaine use reverses striatal plasticity produced during cocaine-seeking. *Biol. Psychiatry.* 81(7), 616-624.
- Spiga, S., Mulas, G., Piras, F., Diana, M., 2014. The "addicted" spine. *Front. Neuroanat.* 8, 110.
- Starke, K., Göthert, M., Kilbinger, H., 1989. Modulation of transmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol. Rev.* 69, 864-989.
- Steinhauser, C., Gallo, V., 1996. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.* 19(8), 339-345.
- Steketee, J.D., Kalivas, P.W., 2011. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol. Rev.* 63, 348-365.
- Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., Malenka, R.C., 2005. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *J. Neurosci.* 25, 3219-3228.

- Stellwagen, D., Malenka, R.C., 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440(7087), 1054-1059.
- Stence, N., Waite, M., Dailey, M.E., 2001. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. 33, 256-266.
- Sternberg, E.M., 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 318-328.
- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A.M., Lambris, J.D., Smith, S.J., John, S.W., Barres, B.A., 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 131, 1164-1178.
- Streit, W.J., Braak, H., Xue, Q.S., Bechmann, I., 2009. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118, 475-485.
- Streit, W.J., Graeber, M.B., Kreutzberg, G.W., 1988. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia*.1, 301-307.
- Streit, W.J., Walter, S.A., Pennell, N.A., 1999. Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* 57, 563-581.
- Su, Z.Z., Leszczyniecka, M., Kang, D.C., Sarkar, D., Chao, W., Volsky, D.J., Fisher, P.B., 2003. Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100, 1955-1960.
- Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W., 1983. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. 36, 165-186.
- Swendsen, J., Conway, K.P., Degenhardt, L., Glantz, M., Jin, R., Merikangas, K.R., Sampson, N., Kessler, R.C., 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, 1117- 1128.
- Swerdlow, N.R., Koob, G.F., 1987. Lesions of the dorsomedial nucleus of the thalamus, medial prefrontal cortex and pedunculo-pontine nucleus: Effects on locomotor activity mediated by nucleus accumbens-ventral pallidal circuitry. *Brain Res.* 412, 233-243.
- Swerdlow, N.R., Vaccarino, F.J., Amalric, M., Koob, G.F., 1986. The neural substrates for the motor activating properties of psychostimulants: a review of recent findings. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 25(1), 233-48.
- Takamori, S., 2006. VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci. Res.* 55(4), 343-351.
- Tamaru, Y., Nomura, S., Mizuno, N., Shigemoto, R., 2001. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience*. 106, 481-503.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K., 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699-1702.
- Taylor, A.M.W., Castonguay, A., Taylor, A.J., Murphy, N.P., Ghogha, A., Cook, C., Xue, L., Olmstead, M.C., De Koninck, Y., Evans, C.J., Cahill, C.M., 2015. Microglia disrupt mesolimbic reward circuitry in chronic pain. *J. Neurosci.* 35(22), 8442-8450.
- Taylor, D.L., Jones, F., Kubota, E.S., Pockock, J.M., 2005. Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor α -induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. *J. Neurosci.* 25, 2952-2964.
- Theis, M., Sohl, G., Eiberger, J., Willecke, K., 2005. Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci.* 28, 188-95.
- Tian, L., Ma, L., Kaarela, T., Li, Z., 2012. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. *J. Neuroinflammation*. 9, 155.
- Tikka, T., Fiebich, B.L., Goldsteins, G., Keinänen, R., Koistinaho, J., 2001. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J. Neurosci.* 21(8), 2580-2588.
- Tilleux, S., Hermans, E., 2007. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *J. Neurosci. Res.* 85, 2059-2070.
- Toda, S., Shen, H., Kalivas, P.W., 2010. Inhibition of actin polymerization prevents cocaine-induced changes in spine morphology in the nucleus accumbens. *Neurotox. Res.* 18, 410-415.
- Toda, S., Shen, H.W., Peters, J., Cagle, S., Kalivas, P.W., 2006. Cocaine increases actin cycling: effects in the reinstatement model of drug seeking. *J. Neurosci.* 26, 1579-1587.

- Tolosa, L., Caraballo-Miralles, V., Olmos, G., Lladó, J., 2011. TNF- α potentiates glutamate-induced spinal cord motoneuron death via NF- κ B. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 46(1), 176-186.
- Torregrossa, M.M., Kalivas, P.W., 2008. Microdialysis and the neurochemistry of addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 90, 261–272.
- Town, T., Nikolic, V., Tan, J., 2005. The microglial “activation” continuum: from innate to adaptive responses. *J. Neuroinflammation*. 2, 24.
- Tranham-Davidson, H., LaLumiere, R.T., Reissner, K.J., Kalivas, P.W., Knackstedt, L.A., 2012. Ceftriaxone normalizes nucleus accumbens synaptic transmission, glutamate transport and export following cocaine self-administration and extinction training. *J. Neurosci.* 32(36), 12406-12410.
- Traynor, B.J., Bruijn, L., Conwit, R., Beal, F., O’Neill, G., Fagan, S.C., Cudkowicz, M.E.. Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology*. 67, 20-7.
- Tremblay, M.E., Lowery, R.L., Majewska, A.K., 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol.* 8(11), e1000527.
- Tremblay, M.E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., Nimmerjahn, A., 2011. The role of microglia in the healthy brain. *J. Neurosci.* 31, 16064-16069.
- Triller, A., Choquet, D., 2003. Synaptic structure and diffusion dynamics of synaptic receptors. *Biol. Cell.* 95(7), 465-476.
- Trussell, L.O., Fischbach, G.D., 1989. Glutamate receptor desensitization and its role in synaptic transmission. *Neuron*. 3(2), 209-218.
- Tsacopoulos, M., Magistretti, P.J., 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* 16, 877-85.
- Tuerk, P.W., Grubaugh, A.L., Hamner, M.B., Foa, E.B., 2009. Diagnosis and Treatment of PTSD-Related Compulsive Checking Behaviors in Veterans of the Iraq War: The Influence of Military Context on the Expression of PTSD Symptoms. *Am. J. Psychiatry*. 166, 762-767.
- Turner, D.A., Adamson, D.C., 2011. Neuronal-astrocyte metabolic interactions: understanding the transition into abnormal astrocytoma metabolism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70(3), 167-76.
- Tyler, W.J., Pozzo-Miller, L., 2003. Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J. Physiol.* 553, 497-509.
- Tynan, R.J., Naicker, S., Hinwood, M., Nalivaiko, E., Buller, K.M., Pow, D.V., Day, T.A., Walker, F.R., 2010. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav. Immun.* 24, 1058-1068.
- Ullman, S.E., Relyea, M., Peter-Hagene, L., Vasquez, A.L., 2013. Trauma histories, substance use coping, PTSD, and problem substance use among sexual assault victims. *Addict. Behav.* 38(6), 2219-23.
- Ungless, M.A., Argilli, E., Bonci, A., 2010. Effects of stress and aversion on dopamine neurons: implications for addiction. *Neurosci. Biobehav. R.* 35, 151-156.
- Ungless, M.A., Singh, V., Crowder, T.L., Yaka, R., Ron, D., Bonci, A., 2003. Corticotropin-releasing factor requires CRF binding protein to potentiate NMDA receptors via CRF receptor 2 in dopamine neurons. *Neuron*. 39(3), 401-7.
- Ungless, M.A., Whistler, J.L., Malenka, R.C., Bonci, A., 2001. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature*. 411, 583-587.
- Vanderschuren, L.J., Kalivas, P.W., 2000. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology*. 151, 2-3, 99-120.
- Vanderschuren, L.J., Wardeh, G., De Vries, T.J., Mulder, A.H., Schoffelmeer, A.N., 1999. Opposing role of dopamine D1 and D2 receptors in modulation of rat nucleus accumbens noradrenaline release. *J. Neurosci.* 19, 4123-4131.
- Ventura, R., Harris, K.M., 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci.* 19, 6897-6906.
- Verkhatsky, A., Kirchhoff, F., 2007. NMDA receptors in glia. *Neuroscientist*. 13, 28-37.
- Vezina, P., 2004. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 827-839.
- Vezina, P., Giovino, A.A., Wise, R.A., Stewart, J., 1989. Environment-specific cross-sensitization between the locomotor activating effects of morphine and amphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32, 581-584.

- Vezina, P., Leyton, M., 2009. Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology*. 56 (Suppl 1), 160-168.
- Vezina, P., Stewart, J., 1990. Amphetamine administered to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens sensitizes rats to systemic morphine: lack of conditioned effects. *Brain Res*. 516, 99-106.
- Vinson, P.N., Justice, J.B. Jr., 1997. Effect of neostigmine on concentration and extraction fraction of acetylcholine using quantitative microdialysis. *J. Neurosci. Meth.* 73, 61-67.
- Virgin, C.E.Jr., Ha, T.P.T., Packan, D.R., Tombaugh, G.C., Yang, S.H., Horner, H.C., Sapolsky, R.M., 1991. Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: implications for glucocorticoid neurotoxicity. *J. Neurochem.* 57, 1422-1428.
- Volkow, N.D., Koob, G.F., McLellan, A.T., 2016. Neurobiologic advances from the brain disease model of addiction. *N. Engl. J. Med.* 374, 363-371.
- Volterra, A., Bezzi, P., 2002. Chapter 13: Release of transmitters from glial cells. In *The Tripartite Synapse: Glia in Synaptic Transmission* (Volterra, A. et al., eds), pp. 164-184, Oxford University Press.
- Volterra, A., Meldolesi, J., 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626-640.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., Nabekura, J., 2009. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci.* 29, 3974-3980.
- Walker, F.R., Beynon, S.B., Jones, K.A., Zhao, Z., Kongsui, R., Cairns, M., Nilsson, M., 2014. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain, Behavior, and Immunity*. 37, 1-14.
- Walker, F.R., Nilsson, M., Jones, K., 2013. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Curr. Drug Targets*. 14, 1262-1276.
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K., Stella, N., 2003. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci.* 23, 1398-1405.
- Wadiche, J.I., Kavanaugh, M.P., 1998. Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter chloride channel. *J. Neurosci.* 18, 7650-7661.
- Wanat, M.J., Hopf, F.W., Stuber, G.D., Phillips, P.E., Bonci, A., 2008. Corticotropin-releasing factor increases mouse ventral tegmental area dopamine neuron firing through a protein kinase C-dependent enhancement of Ih. *J. Physiol.* 586, 2157-2170.
- Wang, J., Lanfranco, M.F., Gibb, S.L., Yowell, Q.V., Carnicella, S., Ron, D., 2013. Long-lasting adaptations of the NR2B-containing NMDA receptors in the dorsomedial striatum play a crucial role in alcohol consumption and relapse. *J. Neurosci.* 30(30), 10187-98.
- Wang, B., Shaham, Y., Zitzman, D., Azari, S., Wise, R.A., You, Z.B., 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, 5389-5396.
- Wang, W., Wang, R., Xu, J., Qin, X., Jiang, H., Khalid, A., Liu, D., Pan, F., Ho, C.S.H., Ho, R.C.M., 2018. Minocycline attenuates stress-induced behavioral changes via its anti-inflammatory effects in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Front Psychiatry*. 9, 558.
- Wang, Y.C., Hsiao, S., 2003. Amphetamine sensitization: nonassociative and associative components. *Behav. Neurosci.* 117, 961-969.
- Wang, Z., Pekarskaya, O., Bencheikh, M., Chao, W., Gelbard, H.A., Ghorpade, A., Rothstein, J.D., Volsky, D.J., 2003. Reduced expression of glutamate transporter EAAT2 and impaired glutamate transport in human primary astrocytes exposed to HIV-1 or gp120. *Virology*. 312, 60-73.
- Watkins, L.R., Hutchinson, M.R., Ledebor, A., Wieseler-Frank, J., Milligan, E.D., Maier, S.F., 2007. Norman cousins lecture. Glia as the "bad guys": implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav. Immun.* 21, 131-146.
- Watt, A.J., Sjostrom, P.J., Hausser, M., Nelson, S.B., Turrigiano, G.G., 2004. A proportional but slower NMDA potentiation follows AMPA potentiation in LTP. *Nat. Neurosci.* 7(5), 518-524.
- Weber, M.D., Frank, M.G., Sobesky, J.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2013. Blocking toll-like receptor 2 and 4 signaling during a stressor prevents stress-induced priming of neuroinflammatory responses to a subsequent immune challenge. *Brain, behavior, and immunity*. 32, 112-21.
- Westbrook, G.L., Sahara, Y., Saugstad, J.A., Kinzie, J.M., Segerson, T.P., 1993. Regulation of ion channels by ACPD and AP4. *Funct. Neurol.* 8, 56.

- White, N.M., 1996. Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. *Addiction*. 91, 921-949.
- White, F.J., Hu, X.T., Zhang, X.F., Wolf, M.E., 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.
- White, F.J., Kalivas, P.W., 1998. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction *Drug Alcohol Depend.* 51(1-2), 141-53.
- White, F.J., Wang, R.Y., 1984. Electrophysiological evidence for A10 dopamine autoreceptor subsensitivity following chronic D-amphetamine treatment. *Brain Res.* 309, 283-292.
- Winder, D.G., Conn, P.J., 1996. Roles of metabotropic glutamate receptors in glial function and glial-neuronal communication. *J. Neurosci. Res.* 46, 131-137.
- Wilker, A., 1973. Dynamics of drug dependence: Implications of a conditioning theory for research and treatment. *Archiv. Gen. Psychiatry.* 28, 611-616.
- Williams, J.M., Steketee, J.D., 2004. Cocaine increases medial prefrontal cortical glutamate overflow in cocaine-sensitized rats: a time course study. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1639-1646.
- Wise, R.A., 1980. Action of drugs of abuse on brain reward systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13, 213-223.
- Wise, R.A., 1996. Neurobiology of addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6(2), 243-251.
- Wohleb, E.S., Delpech, J.C., 2017. Dynamic cross-talk between microglia and peripheral monocytes underlies stress-induced neuroinflammation and behavioral consequences. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry.* 79, 40-48.
- Wohleb, E.S., Godbout, J.P., 2013. Basic aspects of the immunology of neuroinflammation. *Mod. Trends Pharmacopsychiatry.* 28, 1-19.
- Wohleb, E.S., Hanke, M.L., Corona, A.W., Powell, N.D., Stiner, L.M., Bailey, M.T., Nelson, R.J., Godbout, J.P., Sheridan, J.F., 2011. β -Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J. Neurosci.* 31, 6277-6288.
- Wohleb, E.S., Fenn, A.M., Pacenta, A.M., Powell, N.D., Sheridan, J.F., Godbout, J.P., 2012. Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology.* 37(9), 1491-505.
- Wohleb, E.S., Powell, N.D., Godbout, J.P., Sheridan, J.F., 2013. Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. *J. Neurosci.* 33, 13820-13833.
- Wolf, M.E., 1998. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog. Neurobiol.* 54, 679-720.
- Wolf, M.E., 2002. Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. *Molecular Intervention.* 2, 3, 249-255.
- Wolf, M.E., Ferrario, C.R., 2010. AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35(2), 185-211.
- World Drug Report, 2017. United nations office on drugs and crime: world drug report 2017. *SIRIUS-Zeitschrift für Strategische Analysen* 2, 85-86.
- World Drug Report, 2019. United nations office on drugs and crime: world drug report 2019.
- Wright, C.I., Beijer, V.J., Groenewegen, H.J., 1996. Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *J. Neurosci.* 16, 1877-1893.
- Xi, Z.-X., Ramamoorthy, S., Baker, D.A., Shen, H., Samuvel, D.J., Kalivas, P.W., 2002. Modulation of Group II metabotropic glutamate receptor signaling by chronic cocaine. Retrieved from *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 303(2), 608-615.
- Xue, C.-J., Ng, J.P., Li, Y., Wolf, M.E., 1996. Acute and repeated systemic amphetamine administration: effects on extracellular glutamate, aspartate, and serine levels in rat ventral tegmental area and nucleus accumbens. *J. Neurochem.* 67, 352-63.
- Yamada, K., Nabeshima, T., 2004. Pro- and anti-addictive neurotrophic factors and cytokines in psychostimulant addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1025, 198-204.
- Yang, Y., Gozen, O., Watkins, A., Lorenzini, I., Lepore, A., Gao, Y., Vidensky, S., Brennan, J., Poulsen, D., Won Park, J., Li Jeon, N., Robinson, M.B., Rothstein, J.D., 2009a. Presynaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1. *Neuron.* 61, 880-894.

- Yang, G., Pan, F., Gan, W.B., 2009b. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*, 462, 920-924.
- Yin, H.H., Knowlton, B.J., 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Rev. Neurosci.* 7, 464-476.
- Yin, H.H., Ostlund, S.B., Balleine, B.W., 2008. Reward- guided learning beyond dopamine in the nucleus accumbens: the integrative functions of cortico-basal ganglia networks. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1437-1448.
- Yirmiya, R., Goshen, I., 2011. Immune modulation of learning, memory, neural, plasticity and neurogenesis. *Brain Behav. Immun.* 25, 181-213.
- Zahm, D.S., Brog, J.S., 1992. On the significance of subterritories in the 'accumbens' part of the rat ventral striatum. *Neuroscience.* 50, 751-767.
- Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., Barres, B.A., 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci.* 32, 6391-6410.
- Zerangue, N., Kavanaugh, M.P., 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383, 634-637.
- Zhang, G.X., Li, J., Ventura, E., Rostami, A., 2002. Parenchymal microglia of naive adult C57BL/6J mice express high levels of B7.1, B7.2, and MHC class II. *Exp. Mol. Pathol.* 73, 35-45.
- Zhang, H., Wang, F.-W., Yao, I.-L., Hao, A.-J., 2011. Microglia - friend or foe. *Frontiers in Bioscience.* S3, 869-883.
- Zhang, L., Kitaichi, K., Fujimoto, Y., Nakayama, H., Shimizu, E., Iyo, M., Hashimoto, K., 2006. Protective effects of minocycline on behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. *Prog. neuro-psychopharmacol biol psychiatry.* 30, 1381-1393.
- Zhang, X.-F., Hu, X.-T., White, F.J., Wolf, M.E., 1997. Increased responsiveness of ventral tegmental area dopamine neurons to glutamate after repeated administration of cocaine or amphetamine is transient and selectively involves AMPA receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281, 699-706.
- Zhang, X.-Q., Cui, Y., Cui, Y., Chenc, Y., Naa, X.-D., Chend, F.-Y., Weia, X.-H., Li, Y.-Y., Liu, X.-G., Xin, W.-J., 2012. Activation of p38 signaling in the microglia in the nucleus accumbens contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. *Brain, Behavior, and Immunity.* 26, 318-325.
- Zhang, Y., Li, H., Li, Y., Sun, X., Zhu, M., Hanley, G., Lesage, G., Yin, D., 2011. Essential role of toll-like receptor 2 in morphine-induced microglia activation in mice. *Neurosci. Lett.* 489, 43-47.
- Zhao, W., Xie, W., Le, W., Beers, D.R., He, Y., Henkel, J.S., Simpson, E.P., Yen, A.A., Xiao, Q., Appel, S.H., 2004. Activated microglia initiate motor neuron injury by a nitric oxide and glutamate-mediated mechanism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 964-977.
- Zhou, Y., Danbolt, N.C., 2013. GABA and glutamate transporters in brain. *Front. Endocrinol.* 4, 165.
- Zhou, J., Sutherland, M.L., 2004. Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity. *J. Neurosci.* 24(28), 6301-6.
- Zhu, W., Zheng, H., Shao, X., Wang, W., Yao, Q., Li, Z., 2010. Excitotoxicity of TNF α derived from KA activated microglia on hippocampal neurons in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 114, 386-396.
- Zink, M., Vollmayr, B., Gebicke-Haerter, P.J., Henn, F.A., 2010. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology.* 58, 465-473.
- Zipp, F., Aktas, O., 2006. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 29, 518-527.
- Zorec, R., Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Verkhratsky, A., Parpura, V., 2012. Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro.* 4(2).
- Zou, J., Crews, F., 2006. CREB and NF- κ B transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cellular and molecular neurobiology.* 26, 385-405.
- Zou, J., Crews, F., 2010. Induction of innate immune gene expression cascades in brain slice cultures by ethanol: key role of NF- κ B and proinflammatory cytokines. *Alcoholism, clinical and experimental research.* 34, 777-789.
- Zou, J., Crews, F., 2005. TNF α potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF κ B inhibition. *Brain Res.* 1034, 11-24.