



**“ESTRÉS Y VULNERABILIDAD AL CONSUMO DE  
COCAÍNA EN UN MODELO DE  
AUTOADMINISTRACIÓN: REGULACIÓN DE LAS  
RHOGTPASAS EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA EN  
NÚCLEO ACCUMBENS CORE”**

---

**TESIS DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS**

**Bioquímica Daiana Rigoni**

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Farmacología

IFEC-CONICET

Argentina

2021

---

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Flavia Bollati

MIEMBROS DE LA COMISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Kunda

Dr. Carlos Arias

EVALUADOR EXTERNO

Dra. Analía Gabriela Reines

---

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

Durante la ejecución de este trabajo, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) 2015-2021, contó con acreditación del Comité de cuidado de animales (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (Resolución Decanato FCQ-UNC 723/2018) para realizar procedimientos con animales de experimentación, cumplimentó con los cursos requeridos y se desempeñó como profesor asistente (dedicación simple) en el Departamento de Farmacología hasta la fecha. Para su realización contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (FONCyT) e International Society for Neurochemistry (ISN).

---

## **Agradecimientos**

Mi profundo agradecimiento se extiende a todas las personas presentes en mi mente y en mi corazón, que me acompañaron dentro y fuera del laboratorio, durante estos años de aprendizaje y crecimiento profesional, pero sobre todo personal. Todas estas personas que a su modo me guiaron, enseñaron, apoyaron y escucharon, 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. Flavia Bollati, por dirigir este estudio, por recibirme y darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, por su gran generosidad, por su gran capacidad de escucha y comprensión en los momentos difíciles, por sus consejos. Por su solidez académica y criterio científico, por su buena predisposición y por sobre todo su gran compañía. Estaré siempre agradecida por contribuir generosamente a mi formación profesional y permitirme alcanzar este nivel académico.

A la Dra. Liliana Cancela por contribuir a mi formación profesional, por su valiosa generosidad y apoyo, por su solidez académica y criterio científico. Estaré siempre agradecida por ser mi Directora de Beca CONICET y por acompañarme durante estos años.

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

A la Dra. Analía Gabriela Reines (Instituto de Biología Celular y Neurociencia “Prof. Eduardo De Robertis”-CONICET), por aceptar evaluar este trabajo de tesis.

Al grupo de investigación: Julieta Boezio, Andrea Guzmán, Marianela Sánchez, Paula Avalos, por su valiosa ayuda en los experimentos y por tantos momentos compartidos durante estos años.

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 Requena, por su valioso trabajo y excelente soporte técnico en cuanto al cuidado de animales de experimentación.

Al Dr. Gastón Calfa por su colaboración y capacitación para el desarrollo de los experimentos de análisis de espinas dendríticas.

---

Al Dr. Mariano Bisbal (INIMEC-CONICET) por brindarme su laboratorio y guiarme en el camino de la Biología Molecular, por contribuir a mi formación profesional, por la confianza y el apoyo.

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

A la Dra. Silvia M. Pierotti (Catedra de Bioestadística I y II (Departamento de Matemática), FCEFyN, UNC) por su valiosa y generosa colaboración al realizar el análisis de datos mediante Rstudio.

A la Dra. Constanza García-Keller (Department of Neuroscience, Medical University of South Carolina) por su colaboración y apoyo en la discusión e interpretación de resultados.

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 mi familia y amigos por acompañarme en este camino de aprendizaje y crecimiento, por apoyarme y escucharme siempre, sin Uds. este gran logro no hubiese sido posible.

A mi persona favorita que hoy físicamente ya no está conmigo, pero que aún me acompaña, me apoya y me alienta a no bajar los brazos.

Simplemente, gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	11
RESUMEN .....	14
INTRODUCCIÓN.....	19
ESTRÉS Y VULNERABILIDAD A LA ADICCIÓN: MARCO TEÓRICO .....	20
CIRCUITO DE LA MOTIVACION Y NEUROTRASMISIONES ASOCIADAS	22
Circuito de la motivación .....	22
Sinapsis dopaminérgica.....	26
Mecanismo de acción de cocaína .....	27
Sinapsis glutamatérgica.....	27
MODELO DE SENSIBILIZACIÓN A PSICOESTIMULANTES .....	30
Sensibilización .....	30
Iniciación y expresión de la sensibilización .....	31
Sensibilización psicomotora.....	32
Sensibilización neuronal .....	34
Sustratos neurobiólogos de la sensibilización neuronal.....	35
Sensibilización cruzada entre estrés y psicoestimulantes: sustratos neurobiológicos comunes.....	37
Participación de los receptores AMPA en la expresión de la sensibilización conductual inducida por estrés o psicoestimulantes.....	40
MODELO DE AUTOADMINISTRACIÓN DE DROGAS .....	44
Autoadministración .....	44
Rol del estrés en la adquisición de la conducta de autoadministración .....	47
PLASTICIDAD ESTRUCTURAL Y SINÁPTICA ASOCIADA A ESTRÉS Y PSICOESTIMULATES .....	49
Generalidades de las espinas dendríticas .....	49

---

Cambios morfológicos y clasificación de las espinas dendríticas.....	51
Plasticidad estructural y sináptica mediada por psicoestimulantes en el NA .....	53
Plasticidad estructural y sináptica mediada por estrés en el NA.....	56
REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA: PARTICIPACIÓN DE LAS RHOGTPASAS EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA .....	60
RhoGTPasas .....	60
ADF y cofilina.....	63
Papel funcional de cofilina en la plasticidad estructural .....	65
Mecanismos moleculares asociados a la regulación de la actividad de cofilina durante la potenciación a largo plazo .....	67
Papel funcional de cofilina en la acumulación de receptores AMPA .....	68
MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA PLASTICIDAD ESTRUCTURAL INDUCIDA POR ESTRÉS O PSICOESTIMULANTES .....	69
OBJETIVOS .....	75
OBJETIVO GENERAL .....	76
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	78
1. Caracterizar la función de la proteína cofilina en el modelo de sensibilización motora a cocaína inducido por exposición a estrés crónico y su asociación con la adquisición de la conducta de autoadministración de la droga .....	78
2. Caracterizar la función de cofilina en los cambios plásticos en la postsinapsis glutamatérgica en el NA core inducidos por estrés crónico luego de la administración de cocaína.....	79
3. Caracterizar la influencia de cofilina sobre la morfología de las espinas dendríticas en NA core durante la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés ...	80
4. Caracterizar la función de la proteína Rac1 en la señalización inducida por estrés en NA core durante la expresión de la sensibilización motora a cocaína .....	81

---

5. Caracterizar la función de la proteína Rac1 en los cambios plásticos en la postsinapsis glutamatérgica en el NA core inducidos por estrés crónico luego de la administración de cocaína .....	81
MATERIALES Y MÉTODOS .....	83
GENERALIDADES.....	84
Animales.....	84
Estrés por inmovilización.....	84
CONSTRUCTOS DE DNA .....	85
RNA de interferencia de la proteína cofilina .....	85
Mutaciones de la proteína Rac1 .....	85
GENERACIÓN DE PARTICULAS VIRALES .....	86
CIRUGÍAS .....	87
Microinyecciones intracraneales de lentivirus .....	87
Implantación de catéteres permanentes.....	87
ESTUDIOS BIOQUÍMICOS .....	88
Inmunotransferencia.....	88
Biotinilación de las proteínas de superficie.....	89
ESTUDIOS CONDUCTUALES .....	90
Registro de actividad locomotora.....	90
Cajas de condicionamiento operante.....	90
Autoadministración de cocaína .....	92
Autoadministración oral de sacarosa.....	93
HISTOLOGÍA.....	93
ESTUDIOS MICROSCÓPICOS .....	94
Coloración de los procesos dendríticos de las MSNs del NA core .....	94
Microscopía Confocal .....	94
DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS .....	94



---

Análisis de la Densidad de Espinas Dendríticas .....	94
Morfología de las Espinas Dendríticas.....	95
DROGAS .....	95
ANTICUERPOS .....	95
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	96
MODELOS EXPERIMENTALES .....	97
Diseño experimental A: Determinación de los niveles de expresión de proteínas en NA core .....	97
Diseño experimental B: Análisis conductuales, bioquímicos y morfológicos.....	98
Diseño experimental C: Adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína y sacarosa oral.....	100
RESULTADOS .....	102
1. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA COFILINA EN LA VULNERABILIDAD AL CONSUMO DE COCAÍNA INDUCIDA POR ESTRÉS	103
1.1 Curso temporal de los niveles de expresión de las proteínas cofilina, p-cofilina, ratio de p-cofilina/cofilina y actina luego de la infección con las partículas virales del RNA de interferencia de cofilina en NA core .....	103
1.2 La inhibición de la expresión de cofilina en NA core previene la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés .....	108
1.3 Cofilina modula los cambios plásticos estructurales en las espinas dendríticas del NA core en respuesta a cocaína en animales previamente estresados .....	110
1.4 La inhibición de cofilina en NA core previene la expresión de receptores AMPA GluR1 de superficie en animales estresados crónicamente luego de una inyección aguda de cocaína .....	120
1.5 Influencia de la inhibición de la expresión de cofilina en NA core durante la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína inducida por estrés	123
2. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RAC1 EN LA VULNERABILIDAD AL CONSUMO DE COCAÍNA INDUCIDO POR ESTRÉS .....	131

2.1 Curso temporal de niveles de expresión de las proteínas Rac, cofilina, p-cofilina y actina luego de la infección de las partículas virales de Rac1 constitutiva activa y Rac1 dominante negativa en NA core.....	131
2.2 La activación de la proteína Rac1 en NA core regula la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés. ....	136
2.3 La activación de la proteína Rac1 en NA core previene el incremento de receptores AMPA en superficie luego de una inyección aguda de cocaína.....	139
DISCUSIÓN.....	143
1. PARTICIPACION DE COFILINA EN LA VULNERABILIDAD AL CONSUMO DE COCAÍNA INDUCIDA POR ESTRÉS EN EL NA CORE.....	145
2. PARTICIPACION DE COFILINA EN LA REGULACIÓN DE LOS CAMBIOS PLÁSTICOS ESTRUCTURALES Y EN LAS ALTERACIONES EN LA POSTSINAPSIS GLUTAMATÉRGICAS INDUCIDOS POR ESTRÉS CRÓNICO, LUEGO DE LA COCAÍNA EN EL NA CORE.....	150
2.1 Sensibilización cruzada entre estrés y cocaína: Participación de cofilina en la expresión de receptores AMPA en el NA core. ....	150
2.2 Sensibilización cruzada entre estrés y cocaína: Participación de cofilina en los cambios estructurales asociados a la potenciación sináptica en el NA core .....	154
2.3 Sensibilización cruzada entre estrés y cocaína: Participación de cofilina en las modificaciones de la densidad de espinas dendríticas de las MSNs del NA core	157
3. CARACTERIZACIÓN DE LA RHO GTPASA RAC1 EN LA SENSIBILIZACIÓN CRUZADA ENTRE ESTRÉS Y COCAÍNA Y EN LOS CAMBIOS PLÁSTICOS INDUCIDOS POR ESTRÉS EN LA POSTSINAPSIS GLUTAMATÉRTICAS DEL NA CORE.....	163
CONCLUSIÓN .....	167
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	169

**ABREVIATURAS**

AA: Autoadministración

ABPs: Proteínas de unión a actina

ADF: Factor depolimerizante de actina, destrina

ADP: Adenosín difosfato

Amig. ext: Amígdala Extendida

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-4-isoxazole ácido propiónico

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

ATV: Área tegmental ventral

BLA: Amígdala basolateral

CaMKII: Kinasa dependiente de calmodulina II

CFR: Factor de liberación de corticotrofina

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

COMT: Catecol-O-metiltransferasa

CPf: Corteza Prefrontal

CPP: Condicionamiento de preferencia por la droga asociado a un lugar

Cpu: Caudado Putamen

DA: Dopamina

DAT: Transportador de DA

DOPAC: Dihidroxifenilacético

EAAT: Transportadores de aminoácidos excitadores

EPSP: Potenciales postsinápticos excitadores

F-actina: Filamentos de actina

FAK: Quinasa de adhesión focal

GABA: Ácido gama aminobutírico

G-actina: Monómeros de actina

GAPs: Proteínas con actividad GTPasas

GDI: Inhibidores de la disociación de guanina

GDP: Guanosín difosfato

GEFs: Factores intercambiadores de nucleótidos guanina

G<sub>i</sub>: Proteína G inhibitoria

Glu: Glutamato

G<sub>s</sub>: Proteína G estimuladora

GTP: Guanosín trifosfato

HHA: Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

KA: Kainato

LIMK1: LIM kinasa 1

LTD: Depresión a largo plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

MAO: Monoaminaoxidasa

mEPSCs: Corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura

METH: Metanfetaminas

MSNs: Neuronas medias espinosas GABAérgicas

NA: Núcleo accumbens

NET: Noradrenalina

NMDA: N-metil-D-aspartato

p: Fósforo

PAK: Proteína p21-quinasa-activada

PSD: Densidad postsináptica

PTSD: Desordenes de estrés postraumático

ROCK: Rho quinasa

SERT: Serotonina

SNC: Sistema nervioso central

SSH: *Slingshot* fosfatasas

SUDs: Desordenes por el uso de sustancias

Tiam1: Proteína de invasión y metástasis 1 de linfoma T

uEPSC: Corrientes postsinápticas excitatorias unitarias

VGLUTs: Transportador vesicular de glutamato

VMAT2: Transportador vesicular de monoaminas

VP: Ventral Pallidum

# RESUMEN

La evidencia epidemiológica sugiere una alta comorbilidad entre los eventos estresantes de la vida y trastornos de estrés post traumático con aquellos trastornos inducidos por el consumo de drogas de abuso (Boden et al., 2012; Clark et al., 2001; P. C. Ouimette et al., 1998; Sinha, 2001). Las experiencias estresantes juegan un papel clave a lo largo del ciclo de la adicción, incrementando el riesgo de desarrollar trastornos adictivos, incluyendo el mantenimiento de la conducta de consumo y la recaída, inclusive luego de largos periodos libres de droga, lo que sugiere que los circuitos cerebrales que regulan la recompensa y el refuerzo son un centro crítico para los efectos del estrés en el comportamiento (Boyson et al., 2012; Garcia-Keller et al., 2016; Miczek et al., 2008; Moal & Piazza, 1998).

En modelos animales de adicción que utilizan roedores, algunos autores reportaron que la exposición a estrés promueve la capacidad de los psicoestimulantes para incrementar los niveles extracelulares de dopamina (DA) en núcleo accumbens (NA) (Kalivas & Stewart, 1991; Pierce & Kalivas, 1997) potenciando las propiedades estimulantes motoras y reforzantes de los psicoestimulantes, fenómeno conocido como sensibilización cruzada (Marinelli & Piazza, 2002; Pacchioni et al., 2007; Sorg & Kalivas, 1991). En este sentido, reportes de nuestro laboratorio en modelos animales de estrés y abuso de sustancias revelaron que las adaptaciones neurobiológicas duraderas originadas en las sinapsis glutamatérgicas en el NA, subyacen al desarrollo de sensibilización conductual (Esparza et al., 2012; Garcia-Keller et al., 2013), y además facilitan la adquisición de la conducta de autoadministración (AA) de cocaína, alcohol y heroína (Carter et al., 2020; Garcia-Keller et al., 2016; Garcia-Keller, Smiley, et al., 2019).

Las alteraciones del comportamiento asociadas con la sensibilización conductual están mediadas por modificaciones estructurales duraderas en las neuronas del NA. La exposición prolongada a la cocaína aumenta la complejidad y la densidad dendrítica e induce cambios en la morfología de las neuronas medias espinosas GABAérgicas (MSNs en inglés “*medium spiny neurons*”) que conforman el NA (Russo et al., 2010), las cuales son responsables, en parte, del incremento en las propiedades reforzantes de la cocaína y por consiguiente promueven las respuestas conductuales inducidas por la droga (Dietz et al., 2012; H. Shen et al., 2009; Toda et al., 2006; Verma et al., 2019).

Las modificaciones en las espinas dendríticas dependen del remodelado del citoesqueleto de actina (Dietz et al., 2012; Matus, 2005; Russo et al., 2010; H. Shen et al.,

2009; Toda et al., 2006; H. Wang et al., 2005). El recambio de actina es crucial para la fisiología correcta de las espinas (Rust, 2015) y está controlado por proteínas de unión a actina que mantienen el equilibrio entre la actina monomérica (G-actina) y la actina filamentosa (F-actina) dentro de las espinas dendríticas (Dos Remedios et al., 2003). En los últimos años, numerosos trabajos reportaron la participación de los reguladores de la dinámica de actina en la plasticidad estructural inducida por drogas de abuso (J. Li et al., 2015; Russo et al., 2010). En esta línea, se ha descrito que RhoGTPasas como Rac1 y la vía de señalización de RhoA/ROCK se encuentran implicadas en los cambios plásticos ocurridos en el NA asociados al consumo de cocaína. En particular, la administración crónica de cocaína regula negativamente la actividad de la RhoGTPasa Rac1 incrementando la actividad de cofilina en el NA, y este evento molecular se encuentra asociado con una mayor sensibilidad a los efectos de recompensa de la cocaína (Dietz et al., 2012). Además, otros autores reportaron que el remodelado de las espinas dendríticas y la plasticidad sináptica luego de la cocaína involucra la actividad de Rac1, la cual es regulada diferencialmente en NA y Caudado Putamen (Cpu) luego del tratamiento crónico con cocaína (J. Li et al., 2015). En concordancia con estas observaciones, otras investigaciones reportaron la participación de vías de señalización aguas arriba de la cofilina en la plasticidad estructural y conductual a psicoestimulantes inducida por la exposición a estrés (Chandra et al., 2013; Dietz et al., 2012; Fox et al., 2018, 2020; Garcia-Keller et al., 2020; S. A. Golden et al., 2013; Kiraly et al., 2010; J. Li et al., 2015; Qiao et al., 2016; Tu et al., 2019).

A partir de estos antecedentes, en este proyecto abordamos el estudio de los eventos moleculares y celulares implicados en la reorganización del citoesqueleto de actina en las espinas dendríticas y la expresión del receptor ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) en el NA core, mediados por la vía de señalización de la RhoGTPasa Rac1 y la proteína cofilina en un modelo de sensibilización cruzada entre estrés y cocaína y durante la adquisición de la conducta de AA de cocaína.

Particularmente, nosotros proponemos que el estrés crónico, a través de la disminución de la actividad de Rac1, incrementa la actividad de cofilina en las espinas dendríticas del NA core y este mecanismo molecular es el responsable de la expansión de las espinas luego de la cocaína. Así, caracterizamos la vía de señalización de la RhoGTPasa Rac1 y la modulación de la actividad de cofilina en los cambios plásticos de



la postsinapsis glutamatérgica y las modificaciones estructurales de las espinas dendríticas del NA core que median la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducido por estrés crónico. Para ello, utilizando un lentivirus que contiene un RNA de interferencia (shRNA en inglés “*short hairpin RNA*”) específico contra la secuencia de la proteína cofilina de rata (LV-shcofilina) llevamos a cabo el silenciamiento génico de la proteína *in vivo*. Los resultados revelan que la inhibición de la expresión de cofilina en el NA core de animales estresados crónicamente, es suficiente para prevenir la expresión de la sensibilización a la cocaína inducida por el estrés. Además, los bajos niveles de expresión de cofilina en el NA core de ratas previamente expuestas a estrés crónico, impiden el incremento en la expresión del receptor AMPA de superficie inducida por una dosis desafío de cocaína y promueven la reducción del diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas en el NA core de animales expuestos a estrés después de una dosis desafío de cocaína. Asimismo, los bajos niveles de expresión de cofilina en el NA core de animales estresados crónicamente son suficiente para evitar la facilitación de la adquisición de la conducta de AA de cocaína inducida por estrés, y es específico para cocaína, ya que la adquisición de la conducta de AA de sacarosa no se modifica por el tratamiento con shcofilina en animales estresados y no estresados. Estos hallazgos revelan un papel novedoso y crucial de la cofilina en los mecanismos neurobiológicos que sustentan la comorbilidad entre la exposición al estrés y los trastornos relacionados con la adicción. Por otra parte, utilizando dos lentivirus con mutaciones de la proteína Rac1, manipulamos la expresión de la proteína Rac1 *in vivo* en sus dos estados de activación, un estado unido a GTP que promueve la activación constante de la proteína, denominado Rac1 constitutivo activo (LV-Rac CA), y el otro estado unido a GDP que promueve la inactivación constante de la proteína, denominado Rac1 dominante negativo (LV-Rac DN). Los resultados muestran que la sobreexpresión de Rac1 constitutiva activa en el NA core de animales previamente expuestos a estrés crónico es suficiente para prevenir la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés. Además, la expresión de LV-Rac CA en el NA core de ratas estresadas crónicamente impide el incremento en la expresión de los receptores AMPA de superficie inducida por una dosis desafío de cocaína, revelando que el estrés a través de la disminución de la actividad de Rac1 contribuye con las neuroadaptaciones ocurridas en el NA core que sustentan la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína.

En este estudio establecemos que el estrés crónico induce alteraciones a largo plazo en las espinas dendríticas del NA core a través de la desregulación de la señalización de la vía de Rac1 y la actividad de la proteína cofilina y proporcionamos nuevas evidencias de las bases neurobiológicas implicadas en la comorbilidad entre la exposición al estrés y la adicción a la cocaína.

# INTRODUCCIÓN

**ESTRÉS Y VULNERABILIDAD A LA ADICCIÓN: MARCO TEÓRICO**

El consumo de drogas adictivas puede evolucionar desde el uso social de manera controlada, hasta el consumo compulsivo de manera recurrente, lo cual es una característica íntimamente asociada a el desarrollo de adicción. Algunos autores sugieren que esta transición a la adicción ocurre como resultado de la combinación entre factores genéticos, sociales y ambientales que incrementan la vulnerabilidad, con cambios en la plasticidad neuronal en circuitos asociados al aprendizaje reforzado (Kalivas & O'Brien, 2008; Kalivas & Volkow, 2005; Kauer & Malenka, 2007; Kruijssen & Wierenga, 2019). De esta manera, se propone que el consumo de drogas puede inducir cambios transitorios en la plasticidad neuronal de los circuitos involucrados en el aprendizaje y en las respuestas adaptativas de reforzadores naturales, que con el tiempo se establecen como modificaciones permanentes en la plasticidad neuronal e impactan en las alteraciones conductuales a largo plazo que acompañan la adicción, como el consumo compulsivo de drogas y las recaídas (Kalivas & O'Brien, 2008; Robinson & Kolb, 2004).

Las adaptaciones ocurridas en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico originado en el Área Tegmental Ventral (ATV) desempeñan un papel fundamental en el comportamiento temprano asociado a la exposición inicial de la droga, desencadenando adaptaciones a largo plazo en áreas inervadas por las neuronas dopaminérgicas provenientes del ATV (Kauer, 2004; Kauer & Malenka, 2007). En tanto, las adaptaciones ocurridas en el Núcleo Accumbens (NA), el cual recibe proyecciones desde el ATV y otras áreas límbicas, median la formación de vínculos poderosos y persistentes entre el refuerzo asociado a las experiencias con las drogas y las múltiples señales externas e internas asociadas a esa experiencia (Hyman & Malenka, 2001; Kalivas & Volkow, 2005; Kauer & Malenka, 2007; Klawonn & Malenka, 2018; Nestler, 2001), y contribuyen de esta manera al desarrollo de adicciones.

La investigación clínica y epidemiológica indica que a pesar de que un gran número de personas consumen drogas de abuso durante periodos variables de tiempo, solo un porcentaje de ellos desarrollan conductas adictivas, como el uso compulsivo (O'Brien et al., 1986). En este sentido, los estudios epidemiológicos señalan diferencias de género, edad, niveles de educación, ingresos y otras variables socio-demográficas en el desarrollo de adicciones (Anthony et al., 1994; Kessler et al., 2005; Swendsen et al., 2009), así como también, los estudios clínicos describen una fuerte asociación en el

desarrollo de dependencia de sustancias en personas con trastornos psiquiátricos (Conway et al., 2002; Grant et al., 2004; Swendsen et al., 2009). Por su parte, estudios genéticos y biológicos muestran diferencias individuales en la propensión para consumir drogas de abuso (Gelernter & Kranzler, 2009; Koob & Le Moal, 2005).

La evaluación de la influencia del estrés en la adicción revela que las situaciones estresantes pueden incrementar la prevalencia de abuso de drogas en individuos expuestos, por ejemplo, a estresores ambientales y sociales (S. A. Brown et al., 1995), así como también, en pacientes diagnosticados con desórdenes de estrés postraumáticos (PTSD en inglés "*post traumatic stress disorder*") (Jacobsen et al., 2003). Además, existe una alta comorbilidad entre la exposición a estrés y enfermedades psiquiátricas como ansiedad, depresión (Brady, 1997) y abuso de drogas (Kandel et al., 1997). Mientras que, por otra parte, existe en evidencia en la literatura entre la asociación de eventos de abuso sexual o acoso, estrés de combate, estrés ocupacional, y traumas físicos con abuso de psicoestimulantes, opioides o alcohol (Brady et al., 2001; Clark et al., 2001; Reed et al., 2007; Triffleman et al., 1995); y incidentes relacionados con experiencias traumáticas durante la niñez con el incremento en la susceptibilidad al consumo de drogas de abuso (Dube et al., 2003; Fothergill & Ensminger, 2006; Harrison et al., 1997; Mullings et al., 2004; Newcomb & Bentler, 1988; Osler et al., 2007). Por lo tanto, las diferencias individuales dadas por la presencia de factores clínicos, genéticos y biológicos en las personas, pueden contribuir a rasgos o estados que hacen a una persona intrínsecamente más vulnerable al desarrollo de adicción.

El estudio de los circuitos neuronales que median el efecto del estrés en el consumo de drogas sugiere que, tanto el estrés como la exposición a drogas conducen a la activación de áreas cerebrales similares, implicadas en la regulación del estado de ánimo y la motivación (Christoffel, Golden, & Russo, 2011). El estrés puede tener un impacto duradero en la estructura y en la función de los circuitos cerebrales que resultan en cambios duraderos en el comportamiento.

La plasticidad sináptica es el mecanismo por el cual se almacena y mantiene la información dentro de sinapsis, neuronas y circuitos neuronales individuales para guiar el comportamiento de un organismo. Aunque estos mecanismos permiten que el organismo se adapte a su entorno en constante evolución, no todas estas adaptaciones son beneficiosas. Bajo episodios prolongados de estrés físico o psicológico, estos mecanismos se desregulan y la conectividad entre las regiones del cerebro se desequilibra, lo que

resulta en conductas patológicas (Christoffel, Golden, & Russo, 2011). La disfunción de sistemas neuronales de recompensa, como la vía mesocorticolímbica, se encuentra íntimamente asociada con trastornos neuropsiquiátricos, que se caracterizan por estados motivacionales alterados como depresión, ansiedad y adicción a drogas de abuso (Berton & Nestler, 2006; Kalivas & O'Brien, 2008; Kauer & Malenka, 2007; Russo et al., 2010). Una de las primeras evidencias en el estudio de las neuroadaptaciones ocurridas en respuesta a estrés y drogas, reveló que tanto la administración de cocaína, como la exposición a estrés agudo por inmersión en agua fría, desencadenan alteraciones en las propiedades sinápticas en las neuronas del ATV (Borgland et al., 2004; Saal et al., 2003; Ungless et al., 2001) con características similares a la potenciación a largo plazo (LTP en inglés "*long-term potentiation*"), sugiriendo que las neuroadaptaciones comunes podrían explicar, en parte, la comorbilidad observada entre los trastornos de estrés y el uso compulsivo de sustancias. Teniendo en cuenta que, la plasticidad sináptica necesaria para las adaptaciones que resultan de una amplia gama de estímulos (Kauer & Malenka, 2007) tienen lugar en las espinas dendríticas, éstas son consideradas elementos claves de la plasticidad dependiente de las diferentes experiencias (Robinson et al 2004). Por lo tanto, el estudio del impacto del estrés en la plasticidad sináptica de las espinas dendríticas en circuitos neuronales de recompensa y su interacción con el desarrollo de adicción, es uno de los abordajes que intentan comprender los mecanismos moleculares y neurobiológicos que median la influencia facilitadora del estrés en la vulnerabilidad que presentan algunos individuos para desarrollar conductas de consumo de drogas, que pueden llevar a su uso compulsivo.

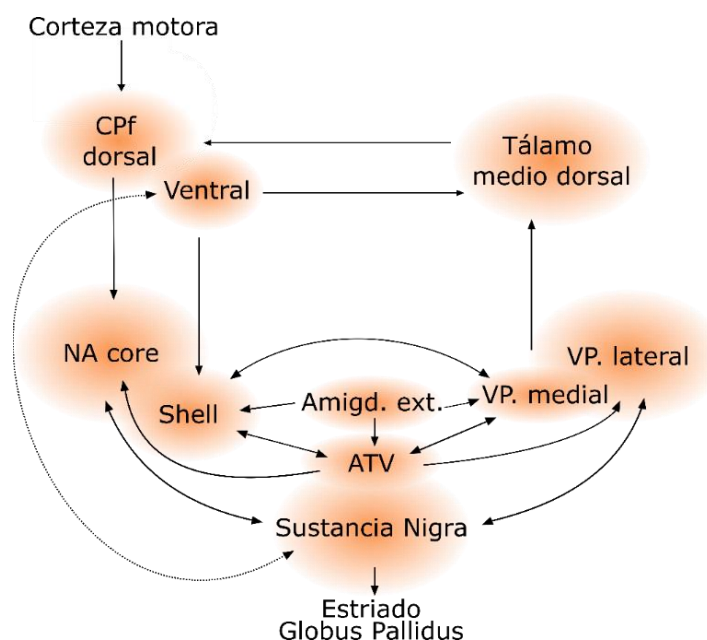
## **CIRCUITO DE LA MOTIVACION Y NEUROTRASMISIONES ASOCIADAS**

### **Circuito de la motivación**

El circuito de la motivación está asociado a la conversión de estímulos biológicamente relevantes en una respuesta conductual adaptativa (Pierce & Kalivas, 1997). Comprende regiones cerebrales que son activadas en respuesta a estímulos gratificantes, como por ejemplo, el sexo o la alimentación rica en nutrientes, y regula de esta manera complejos procesos cognitivos, como la motivación, las expectativas y las emociones (Koob & Le Moal, 2005; Volkow et al., 2017). Los estudios realizados sobre este circuito neuronal revelaron que los núcleos interconectados que conforman el

circuito motriz actúan en conjunto permitiendo o bloqueando la expresión de respuestas conductuales dadas por un estímulo ambiental o farmacológico (Le Moal & Simon, 1991). De esta manera, este circuito es considerado como un mecanismo de control capaz de determinar tanto el umbral del estímulo como la intensidad de la respuesta.

Anatómicamente está comprendido principalmente por las vías dopaminérgicas mesolímbicas y mesocorticales, y haces provenientes del proencéfalo medial y de la amígdala extendida (Koob & Le Moal, 2005; Lammel et al., 2011). La vía mesolímbica incluye proyecciones dopaminérgicas que se originan en el Área Tegmental Ventral (ATV) e inervan principalmente las neuronas medias espinosas GABAérgicas (MSNs en inglés “*medium spiny neurons*”) del Núcleo Accumbens (NA). La vía mesocortical, comprende las proyecciones de neuronas dopaminérgicas originadas en el ATV que inervan la Corteza Prefrontal (CPf) (Lammel et al., 2014; Lüscher & Malenka, 2011). Asimismo, la liberación de dopamina por parte de las neuronas del ATV hacia estas estructuras está regulada por un tono inhibitorio proveniente de la CPf y el NA (Carr & Sesack, 2000). Todos estos núcleos que conforman el circuito de la motivación están topográficamente interconectados de manera que permiten el flujo de la información desde las regiones límbicas hacia los circuitos motores piramidales y extrapiramidales (Pennartz et al., 1994). En la **Figura 1** se encuentra ilustrada la topografía de las interconexiones de los núcleos del circuito que proporcionan el marco anatómico para el flujo de la información desde regiones límbicas hacia centros motores. La amígdala inerva hacia el ATV, NA shell y a la zona ventromedial del Ventral Pallidum (VP). Estos tres núcleos se encuentran interconectados entre sí, pero no con el sistema motor. Para acceder a los núcleos que regulan directamente la actividad motora, las proyecciones del ATV hacia NA core y la zona dorsolateral VP están conectados con sistemas motores extrapiramidales a través de la Sustancia Nigra. Además, la zona ventromedial de VP proyecta a la parte mediodorsal del tálamo y este último inerva a la corteza dorsal (CPf dorsal), que a su vez proyecta a NA core y Sustancia Nigra. De esta manera, el componente talámico del circuito permite el flujo de información al sistema extrapiramidal, vía interconexiones con la CPf.



**Figura 1. Circuito de la Motivación. Imagen adaptada de Pierce y Kalivas (Pierce & Kalivas, 1997).**

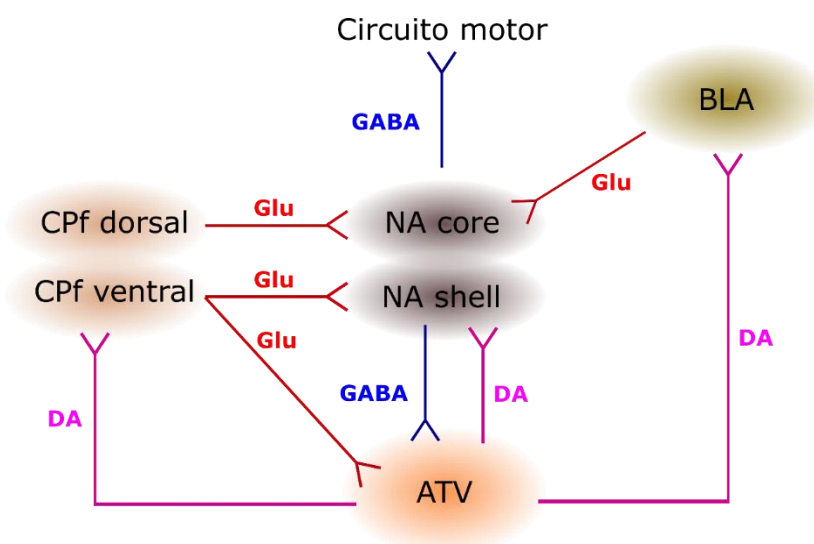
La imagen es una representación de las interconexiones entre los subnúcleos del circuito e ilustra cómo la información se transmite desde el sistema límbico, amígdala extendida (Amigd. ext) al sistema motor piramidal y extrapiramidal, Tálamo mediodorsal, Ventral Pallidum lateral (VP. lateral), Ventral Pallidum medial (VP medial), Núcleo Accumbens Core (NA core), Núcleo Accumbens Shell (Shell), Corteza Prefrontal dorsal (CPf dorsal), Corteza Prefrontal ventral (Ventral), Sustancia Nigra, Área Tegmental Ventral (ATV).

Dentro de este circuito, el NA fue sugerido como la interfase entre el estímulo emocional y la conducta motora. Este núcleo está formado por un conjunto de neuronas diversas, la mayoría de las cuales son eferentes de MSNs. Estas neuronas se diferencian en dos subpoblaciones de acuerdo a la expresión de receptores dopaminérgicos, denominados receptores D<sub>1</sub> o receptores D<sub>2</sub>, y su actividad juega un papel fundamental en los comportamientos asociados a la recompensa (Calipari et al., 2016; Floresco, 2015; Francis et al., 2015; Francis & Lobo, 2017; Lobo et al., 2010; Lobo & Nestler, 2011; Nestler et al., 2002; Russo & Nestler, 2013). Además, estas poblaciones neuronales residen en dos subregiones anatómica y funcionalmente diferentes denominadas core y shell. El core es la región que rodea a la Comisura Anterior, mientras que el shell es la región ventral y medial al core con forma de medialuna (Brog et al., 1993; Zahm & Brog, 1992). Estas dos poblaciones neuronales que comprenden las dos subregiones del NA tienen diferentes proyecciones aferentes y eferentes (Zahm, 2000) y juegan roles distintos en la generación de las conductas de recompensa (Ito et al., 2004). El shell se encuentra



incluido en la amígdala extendida (Amig. ext) (Heimer et al., 1991) y está involucrado en la regulación de la motivación y el reforzamiento (Di Chiara, 1998, 2002). Por otro lado, el core está relacionado con el estriado, tanto anatómica como funcionalmente; y por ende, está involucrado en la integración sensoriomotora de la conducta (Zahm & Brog, 1992). De esta manera, podría decirse que las propiedades emotivas o motivacionales están codificadas en el NA shell y las propiedades estimulantes motoras codificadas en el core. Así, el shell tendría un rol preponderante durante el desarrollo de la adicción, mientras que el core mediaría la ejecución a largo plazo de las conductas relacionadas con la adicción (Di Chiara, 2002; Ito et al., 2004; Meredith et al., 2008).

La respuesta conductual a estímulos biológicamente relevantes está asociada a la liberación de neurotransmisores (Pierce & Kalivas, 1997). La **Figura 2** muestra los diferentes neurotransmisores asociados con las proyecciones aferentes y eferentes que conforman este circuito, en donde los principales aminoácidos excitatorios comprendidos son el glutamato (Glu), el cual interactúa con la dopamina (DA). Las aferencias excitatorias glutamatérgicas que llegan al NA provienen principalmente de Amígdala Basolateral (BLA), Hipocampo y CPf, mientras que las aferencias dopaminérgicas que inervan el NA provienen del ATV. Por su parte la BLA y la CPf también reciben terminales dopaminérgicas provenientes del ATV.



**Figura 2. Neurotransmisiones implicadas en el circuito de la motivación. Imagen adaptada de Vanderschuren y Kalivas (Vanderschuren & Kalivas, 2000).** Imagen ilustrativa de las principales conexiones dopaminérgicas (líneas rosas), glutamatérgicas (líneas rojas) y GABAérgicas (líneas azules) de los núcleos que forman parte del circuito de la motivación. Amígdala Basolateral (BLA), Núcleo

Accumbens core (NA core) y Núcleo Accumbens shell (NA shell). Corteza Prefrontal dorsal (CPf dorsal), Corteza Prefrontal ventral (CPf ventral), Área Tegmental Ventral (ATV).

### **Sinapsis dopaminérgica**

#### **Síntesis, transporte y metabolismo de la dopamina**

La dopamina (DA) es la catecolamina más abundante en el Sistema Nervioso Central (SNC). Su síntesis se origina en las neuronas dopaminérgicas a partir del aminoácido tirosina por la acción secuencial de dos enzimas denominadas, tirosina-hidroxilasa (citosólica) y dopa-descarboxilasa (Freund y col., 1984). Una vez sintetizada, la dopamina es incorporada a las vesículas a través de un transportador de alta afinidad denominado transportador vesicular de monoaminas (VMAT2). La despolarización de la membrana ante la llegada de un potencial de acción, favorece la apertura de canales de calcio voltaje dependientes y la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la fusión de las vesículas con la membrana sináptica, provocando la descarga del neurotransmisor al espacio sináptico. Una vez liberada la dopamina a la hendidura sináptica, puede ser eliminada del espacio sináptico por un proceso de difusión hacia regiones extrasinápticas, en donde se localizan transportadores específicos (DAT) que reintroducen la dopamina al terminal presináptico (Feldman y col., 1997). Después de ser recaptada, la dopamina es metabolizada por acción de la monoaminaoxidasa (MAO) neuronal, para dar lugar al precursor dihidroxifenilacético (DOPAC). En el espacio extra neuronal, la dopamina se transforma por acción de la catecol-O-metiltransferasa (COMT), en ácido homovanílico (HVA), el cual es el metabolito más abundante en el cerebro humano.

#### **Receptores de dopamina**

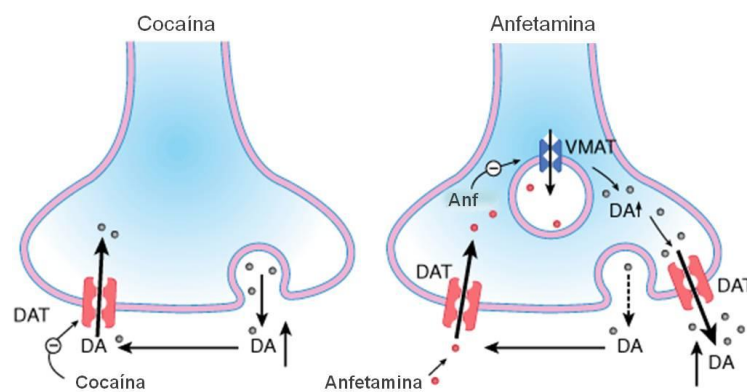
Existen cinco tipos de receptores dopaminérgicos, reagrupados farmacológicamente en dos tipos: el receptor  $\text{D}_1$ , que engloba a los receptores  $\text{D}_1$  y al  $\text{D}_5$  acoplados a proteína  $\text{G}_s$  (estimuladora, activan a la enzima adenilato ciclasa desencadenando la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC)), de localización postsináptica, y el receptor  $\text{D}_2$  (correspondiente a las isoformas  $\text{D}_2$ ,  $\text{D}_3$  y  $\text{D}_4$ ), acoplados a proteína  $\text{G}_i$  (inhibitoria, inhibe la formación de AMPC), de localización presináptica, implicado en la regulación de la actividad de neuronas dopaminérgicas (autorreceptores) (Sibley et al., 1993). Los receptores  $\text{D}_1$  son los más abundantes en el SNC y se localizan en todas las áreas que reciben inervación dopaminérgica. Los receptores  $\text{D}_2$  se localizan en neuronas que sintetizan dopamina y son más abundantes en las terminales

dopaminérgicas que inervan el estriado y el NA, y el cuerpo celular de las neuronas de la Sustancia Nigra y ATV (Sibley et al., 1993).

### Mecanismo de acción de cocaína

La cocaína es un alcaloide que se obtiene a partir de las hojas de diversas especies de *Erythroxylon*, principalmente del arbusto *E.coca*. El mecanismo de acción de la cocaína consiste en su unión a las proteínas transportadoras de dopamina (DAT), serotonina (SERT) y noradrenalina (NET) bloqueando su ingreso a nivel presináptico. Esta inhibición en la recaptación de neurotransmisores, eleva las concentraciones sinápticas de cada uno de ellos en la hendidura sináptica, y, por lo tanto, potencia y prolonga sus acciones centrales y periféricas (**Figura 3**).

El efecto psicoestimulante de la cocaína, está directamente asociado a su capacidad para potenciar la actividad dopaminérgica dentro de los circuitos mesolímbico y mesocortical, mientras que la prolongación del efecto de la dopamina en el sistema límbico, se asocia a la intensa euforia.



**Figura 3.** Imagen representativa del mecanismo de acción de cocaína y anfetamina. DAT: transportador de DA, VMAT: transportador vesicular de monoaminas.

### Sinapsis glutamatérgica

#### Síntesis, almacenamiento y metabolismo del glutamato

El glutamato es el mayor neurotransmisor excitatorio del SNC. El L-glutamato es sintetizado en el terminal nervioso a partir de la transaminación de  $\alpha$ -oxoglutarato o de la glutamina sintetizada en células gliales (Niciu et al., 2012). Una vez sintetizado el glutamato citosólico, atraviesa la membrana vesicular a través de un transportador (VGLUTs) para almacenarse en el terminal presináptico hasta el momento de su

liberación. Ante la llegada de un potencial de acción, se produce la despolarización de la membrana y apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la fusión de las vesículas con la membrana sináptica, provocando la descarga del neurotransmisor al espacio sináptico.

La desregulación de la neurotransmisión glutamatérgica puede resultar en una alta concentración de glutamato extrasináptico, lo cual conduce a daños en la neurona (Hardingham et al., 2002; Vanhoutte & Bading, 2003). Por lo cual, en una escala de milisegundos el glutamato debe ser removido del espacio sináptico para evitar el daño. El glutamato es eliminado activamente de la hendidura sináptica hacia el citosol del terminal nervioso a través de transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT), los cuales actúan en contra de su gradiente de concentración. Además, estos transportadores se ubican en células gliales, las cuales incorporan glutamato, para posteriormente ser devuelto al terminal presináptico en forma de glutamina (Niciu et al., 2012).

### **Receptores de glutamato**

Los receptores de glutamato pueden dividirse en dos categorías: ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos de glutamato son canales iónicos que transportan cationes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ). Los receptores metabotrópicos, por otro lado, activan o inhiben los sistemas de segundos mensajeros a través de interacciones con proteínas G. Se identificaron tres clases de receptores ionotrópicos de glutamato, que fueron nombrados de acuerdo a su afinidad por el agonista: N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-ácido metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y kainato (KA). Estos receptores forman complejos tetraméricos de subunidades individuales/heteroméricas y una de las características particulares de estos receptores es su diversidad de propiedades de canal basadas en la composición de subunidades y el perfil de expresión en el cerebro de los mamíferos (Niciu et al., 2012).

Los receptores AMPA median la neurotransmisión excitatoria rápida en respuesta a la unión del glutamato en el SNC (Palmer et al., 2005) y su tráfico dentro y fuera de la sinapsis conduce a cambios en la fuerza sináptica en procesos de plasticidad (Rust, 2015; Rust et al., 2010). Los receptores AMPA están conformados por cuatro subunidades que pueden variar desde la subunidad GluR1 hasta la GluR4, la combinación de estas subunidades con diferente estequiometría le confiere al canal iónico propiedades particulares (Niciu et al., 2012). El receptor nativo tiene muy baja permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ ,

y la presencia de la subunidad GluR2 determina las propiedades del canal iónico asociado, ya que su ausencia aumenta la permeabilidad del canal al  $\text{Ca}^{2+}$  (Michaelis, 1998).

La liberación de glutamato en concentraciones pequeñas y breves (menos de 1 milisegundo) en la hendidura sináptica genera potenciales postsinápticos excitadores (EPSP en inglés “*excitatory postsynaptic potentials*”) mediados por la activación de receptores AMPA, que producen corrientes con un rápido impulso ascendente y una rápida caída de la corriente. Mientras que la activación del receptor NMDA proporciona una fase más prolongada de despolarización que puede durar varios cientos de milisegundos. Por lo cual, se propone que la generación de EPSP está controlada por la activación del receptor AMPA, mientras que, la farmacocinética más prolongada de la sensibilización del receptor de NMDA proporciona amplia oportunidad para la suma espacial y temporal en numerosas entradas postsinápticas (Niciu et al., 2012).

El tráfico de receptores AMPA se encuentra ampliamente estudiado, especialmente su ciclo intracelular y sus posibles secuelas fisiológicas. Como todos los receptores de membrana, los receptores AMPA son sintetizados en el soma y transportados a la superficie celular a través de la vía secretora, la cual involucra múltiples pasos y proteínas de transporte del citoesqueleto (Kapitein et al., 2010; Kennedy & Ehlers, 2006). Su localización a nivel dendrítico es regulado a través de dos mecanismos: (1) el tráfico y reciclaje exocítico y endocítico en la vía secretora y (2) la difusión de la membrana desde localizaciones extrasinápticas a sinápticas (Groc & Choquet, 2006; Newpher & Ehlers, 2008; Z. Wang et al., 2008). La modulación del citoesqueleto de actina es un mediador crítico de la señalización del receptor glutamatérgico AMPA en la sinapsis, ya que el aumento de la actividad sináptica conduce a cambios morfológicos de las espinas dendríticas, así como también a cambios bioquímicos y efectos electrofisiológicos del orden de minutos. Por lo cual, la regulación de la dinámica de actina en las espinas dendríticas es crítica en el tráfico de receptores AMPA (Rust, 2015; Rust et al., 2010).

Fisiológicamente, el tráfico de los receptores AMPA y la difusión hacia la superficie neuronal, se encuentran asociados a la plasticidad del aprendizaje y la memoria. En este sentido, un fortalecimiento similar al LTP en las sinapsis neocorticales ocurre después de la estimulación sensorial in vivo (A. Holtmaat & Svoboda, 2009; Kessels & Malinow, 2009; Malinow & Malenka, 2002) y este proceso depende del número de receptores AMPA, la localización y facilitación en las sinapsis (Takahashi et al., 2003).

El aprendizaje en el hipocampo también está regulado por la dinámica del receptor AMPA (Whitlock et al., 2006) después del condicionamiento de miedo (Matsuo et al., 2008). Las hormonas del estrés también desempeñan un papel relevante en el tráfico de receptores AMPA (Groc & Choquet, 2006; Martin et al., 2009; Yuen et al., 2011), lo cual proporciona un mecanismo para los efectos facilitadores y supresores dependientes de la dosis de las hormonas corticosteroides en plasticidad sináptica y cognición (Martin et al., 2009).

### **MODELO DE SENSIBILIZACIÓN A PSICOESTIMULANTES**

#### **Sensibilización**

La explicación contemporánea sobre el desarrollo de la adicción propone que las personas adictas estaban motivadas a consumir drogas por el placer que producen las drogas en sí (básicamente para lograr el placer recordado), o para evitar las desagradables consecuencias de la abstinencia. Sin embargo, el comportamiento compulsivo de búsqueda y consumo de drogas que caracterizan a la adicción no siempre está motivado por el deseo de obtener placer o el deseo de aliviar la abstinencia (Robinson & Berridge, 1993, 2001).

El abordaje de la adicción desde la “sensibilización del incentivo” propuesto por Robinson y Berridge se basa en cuatro postulados que siguieron: (1) que las drogas potencialmente adictivas conducen a cambios duraderos en la organización de circuitos neurales, (2) que los sistemas cerebrales alterados por el consumo de drogas incluyen aquellos normalmente involucrados en el procesamiento del incentivo, la motivación y la recompensa, (3) que las neuroadaptaciones inducidas por las drogas en circuitos neuronales que median la recompensa conducen a un incremento en la sensibilidad de los mismos a las drogas y a los estímulos asociados a las drogas (“sensibilización neuronal”), y por último, (4) que los sistemas cerebrales que están sensibilizados no median los efectos placenteros o eufóricos de las drogas (el “gusto” por las drogas), pero si son los encargados de mediar un subcomponente de recompensa denominado prominencia de incentivo o el “querer” (Berridge et al., 1989; Robinson & Berridge, 1993, 2001). Así, esta teoría postula que el proceso psicológico de la prominencia de los incentivos es específicamente el responsable del comportamiento de búsqueda y consumo de las drogas (el “querer” consumir drogas).

De esta manera, la “sensibilización del incentivo” se basa en la hipótesis de que las drogas producen una sensibilización del procesamiento incentivo-saliente que conduce a la búsqueda compulsiva y el consumo de las drogas (Berridge & Robinson, 1995; Robinson & Berridge, 1993). En otras palabras, a través del aprendizaje asociativo, se incrementa el valor del incentivo centrado específicamente en los estímulos relacionados con las drogas, que conducen a patrones de comportamiento cada vez más compulsivos de búsqueda y consumo de drogas. Además, la persistencia de las neuroadaptaciones originadas por las drogas sería la responsable de la susceptibilidad que presentan las personas adictas a recaer incluso luego de largos periodos de tiempo de que se ha interrumpido el consumo de drogas.

### **Iniciación y expresión de la sensibilización**

La evidencia experimental de la existencia de sensibilización neuronal, por ejemplo, luego de la administración de psicoestimulantes, es la sensibilización locomotora caracterizada por un incremento en la respuesta conductual a la droga. El estudio de los mecanismos involucrados en la sensibilización neuronal puede examinarse en dos dominios anatómica y temporalmente distintos, denominados iniciación y expresión (Kalivas & Stewart, 1991).

El inicio de la sensibilización involucra una secuencia transitoria de eventos celulares y moleculares precipitados por la administración de la droga que conducen a cambios duraderos en la función neural, los cuales son los responsables de la sensibilización locomotora descrita en respuesta a la administración de psicoestimulantes y su re exposición (Pierce & Kalivas, 1997). Por otra parte, la expresión de la sensibilización enmarca las alteraciones neuronales duraderas que surgen del proceso de iniciación, las cuales son las encargadas de mediar directamente el incremento de la respuesta conductual luego de la re exposición a la droga (Pierce & Kalivas, 1997).

Estos dos procesos difieren temporal y anatómicamente. En este sentido, el inicio de la sensibilización conductual se origina en Área Tegmental Ventral (**Figura 1**, ATV), conformada por los núcleos de las células de dopaminérgicas del mesencéfalo ventral que dan lugar a la vía mesocorticolímbica (Fallon et al., 1978). En contraste, aquellos eventos neuronales asociados con la etapa de expresión se distribuyen entre los núcleos interconectados que forman parte del circuito de motivación, más específicamente en el Núcleo Accumbens (**Figura 1**, NA) (Vanderschuren & Kalivas, 2000). Esta separación anatómica de los sitios de iniciación respecto de la expresión de la sensibilización implica,

a grandes rasgos, la transferencia de información desde ATV hacia el NA, como resultado de cambios en la plasticidad sináptica y estructural en las proyecciones de estas estructuras.

### **Sensibilización psicomotora**

En animales de experimentación la exposición repetida a drogas de abuso (principalmente psicoestimulantes, como cocaína y anfetamina) induce cambios persistentes y duraderos en el comportamiento, asociados a la activación del circuito psicomotor mediado por las drogas, desencadenando el incremento en la actividad locomotora, el comportamiento de rotación y las conductas estereotipadas en roedores (Robinson & Becker, 1986; Robinson & Berridge, 1993). Dichas alteraciones en el comportamiento pueden ser evidenciadas por la reexposición de los animales a la misma droga, luego de un periodo variable de tiempo (Robinson & Becker, 1986; Robinson & Berridge, 1993).

El sustrato neural encargado de mediar este efecto activador de las drogas sobre el circuito psicomotor se superpone con el sustrato neural responsable de los efectos gratificantes de las drogas (Robinson & Becker, 1986; Robinson & Berridge, 1993), específicamente el encargado de mediar ambos efectos es el circuito dopaminérgico mesocorticolímbico (**Figura 1**), y en especial, las proyecciones dopaminérgicas que inervan el NA (**Figura 2**) (Robinson & Berridge, 2001).

La sensibilización psicomotora es un fenómeno complejo, ya que, por ejemplo, es dependiente de la dosis de droga administrada (Browman et al., 1998; Robinson & Berridge, 2001), así como también, por lo general, solo se observa cuando las drogas se administran de forma intermitente (Robinson & Becker, 1986), y a menudo es más evidente mucho tiempo después de la interrupción del tratamiento farmacológico repetido (Antelman, 1988; Paulson et al., 1991; Valadez & Schenk, 1994). En este sentido, Paulson y col (Paulson et al., 1991) demostraron que ratas expuestas a un tratamiento con anfetamina manifestaron sensibilización conductual incluso hasta un año después de la última exposición a la droga (Paulson et al., 1991), lo que sugirió que animales sensibilizados siguen siendo hipersensibles a los efectos psicomotores y gratificantes de la droga luego de largos periodos de tiempo (Paulson et al., 1991; Valadez & Schenk, 1994), y es esta persistencia una de las característica más notables de la sensibilización (Paulson et al., 1991; Robinson & Becker, 1986). Además, la sensibilización psicomotora se describió no solo después de que la droga es administrada por el operador



(administración no-contingente), sino también, en modelos animales basados en el condicionamiento operante, en donde son los propios animales quienes se autoadministran la droga (administración contingente) (Weeks, 1962).

Otra característica importante de la sensibilización es la variabilidad individual observada en la susceptibilidad a desarrollar sensibilización (Robinson et al., 1988). En este sentido, se describió que algunas personas desarrollan sensibilización de manera rápida y robusta con una dosis determinada de droga, otras, en cambio, sensibilizan muy poco, y en la mayoría de los casos se han descrito muchos factores que contribuyen a esta variabilidad individual en la susceptibilidad a desarrollar sensibilización, incluidos factores genéticos, hormonales y experimentales (Antelman et al., 1980; Robinson et al., 1988).

La sensibilización está modulada por el aprendizaje y las situaciones vinculadas a la administración de la droga (Browman et al., 1998). Los estímulos ambientales o las claves asociadas a la administración de la droga pueden adquirir potentes propiedades de estímulos condicionados, y por lo tanto, la capacidad de modificar el comportamiento en curso, incluso en ausencia de la droga (Davis & Smith, 1976; Tomie, 1996). Esta capacidad del contexto para modular la sensibilización puede estar relacionada con su capacidad para modular los circuitos neuronales comprometidos durante el consumo de las drogas, por lo cual, la sensibilización no es una consecuencia de la exposición a drogas potencialmente adictivas o un simple fenómeno asociado a un tratamiento farmacológico. Tanto la expresión como la iniciación de la sensibilización pueden ser modulados por factores no farmacológicos, incluidos factores ambientales asociados con la administración de la droga.

Asimismo, la sensibilización puede ocurrir en respuesta a distintas drogas, si bien se describió principalmente en respuesta psicoestimulantes, tales como cocaína y Anfetamina, también puede ocurrir en respuesta a morfina, nicotina y  $\Delta^9$ -tetrahidrocanabinol, ya sea luego de la administración aguda o crónica de la misma droga (Benwell & Balfour, 1992; Cunningham & Noble, 1992; Joyce & Iversen, 1979; Post et al., 1992; Robinson & Becker, 1986). Además, la exposición a diferentes drogas, puede mejorar la capacidad de respuesta conductual y neuronal a otras drogas (Berridge, 2004). Este fenómeno se ha definido como sensibilización cruzada. Las drogas pueden sensibilizar de manera cruzada, no solo entre psicoestimulantes, como cocaína y Anfetamina (Bonate et al., 1997; Vanderschuren et al., 1999) sino también entre drogas

de diferentes clases como por ejemplo anfetamina y morfina (Vanderschuren et al., 1997; Vezina & Stewart, 1990). Por lo cual, si bien el sitio de acción molecular de una droga de abuso determina el sustrato neuronal de partida para la inducción de los cambios plásticos que se van a manifestar como sensibilización psicomotora, se sugirió la existencia de mecanismos neurobiológicos comunes que subyacen al desarrollo de sensibilización, independientemente del tipo de droga y su mecanismo de acción.

### **Sensibilización neuronal**

Los efectos de las drogas sobre la activación del circuito psicomotor indican, de manera indirecta, que las drogas adictivas inducen sensibilización neuronal, lo que se traduce en un incremento de las propiedades motivacionales y de los efectos gratificantes de drogas (Wise & Bozarth, 1987). La evidencia más directa de que el sustrato neural que está sensibilizado es el encargado de mediar la recompensa de las drogas proviene de numerosos informes que demuestran que la exposición previa a una variedad de drogas potencialmente adictivas, como por ejemplo los psicoestimulantes, mejoran posteriormente la capacidad para adquirir la conducta de AA de drogas (Hooks et al., 1994; Horger et al., 1990; Moal & Piazza, 1998; P. V. Piazza et al., 1989) y también incrementan la motivación de los animales para conseguir la droga al ser expuestos a un paradigma de AA de radio progresivo (Ferrario & Robinson, 2007). Además, la previa inducción de sensibilización incrementa el condicionamiento de preferencia por la droga asociado a un lugar (CPP) (Gaiardi et al., 1991; Lett, 1989), resaltando de esta manera la capacidad de la sensibilización para potenciar los efectos gratificantes de algunas drogas como morfina, cocaína o anfetamina (Horger et al., 1990; P. V. Piazza et al., 1989; Vezina et al., 2002) y el desarrollo de conductas similares a la adicción, como el aumento del consumo de drogas (Ferrario & Robinson, 2007).

Por lo tanto, el modelo de sensibilización es relativamente simple y útil para estudiar las neuroadaptaciones que acompañan a la sensibilización psicomotora que se superponen, al menos en parte, con aquellas que subyacen a una mayor motivación por las drogas. Además, se sugiere que estas neuroadaptaciones que acompañan la sensibilización pueden jugar un papel importante en la recaída, una de las características la adicción (Robinson & Berridge, 1993; Vanderschuren & Pierce, 2010).

### **Sustratos neurobiológicos de la sensibilización neuronal**

Los estudios sobre la neurobiología de la sensibilización evidencian que la sensibilización conductual está asociada con neuroadaptaciones en el circuito mesocorticolímbico, que implican alteraciones en la plasticidad sináptica y estructural en el NA, e involucran la participación de la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica (Kalivas & Stewart, 1991; Robinson & Berridge, 1993; White & Kalivas, 1998). Particularmente, la plasticidad sináptica del NA tiene un papel clave en el aprendizaje asociado con la recompensa y en las propiedades reforzantes de las drogas de abuso, y por lo tanto, las adaptaciones en las proyecciones sinápticas excitatorias que inervan el NA son importantes mediadoras de los cambios en el comportamiento relacionados con la adicción (Berke & Hyman, 2000; Hyman & Malenka, 2001; Kalivas & Volkow, 2005; Kauer, 2004; Pierce & Kalivas, 1997; Robinson & Becker, 1986; Robinson & Berridge, 1993; Vanderschuren et al., 1999).

La administración de psicoestimulantes como cocaína y anfetaminas, inducen una rápida liberación extracelular dopamina (DA) en el NA y estriado en animales sensibilizados (Berke & Hyman, 2000; Hyman & Malenka, 2001; Kalivas & Volkow, 2005; Kauer, 2004; Pierce & Kalivas, 1997; Robinson & Becker, 1986; Robinson & Berridge, 1993; Vanderschuren et al., 1999). Este incremento en la liberación de DA en el NA está dado por el incremento en la excitabilidad de las neuronas del ATV, y a su vez, conduce a alteraciones en la postsinapsis, que se caracterizan por un aumento en la sensibilidad de los receptores de dopamina D<sub>1</sub> (White & Kalivas, 1998) y la disminución de la sensibilidad de los autorreceptores D<sub>2</sub> (White & Wang, 1984). Esta liberación de DA contribuye con la expresión de la sensibilización, y es más evidente luego de al menos una semana de abstinencia. En relación con estas observaciones, estudios de neuroimágenes realizadas en individuos sanos reportaron un incremento en el flujo DA en el NA luego del consumo agudo de alcohol y anfetamina (Boileau et al., 2006; Leyton et al., 2002) y son consistentes con las evidencias preclínicas observadas en roedores expuestos a la administración aguda de cocaína o heroína (Kalivas & Duffy, 1990). Además, en consumidores crónico de cocaína se observó un incremento en la liberación de DA en CPf y el estriado en respuesta a claves asociadas al consumo de la droga, lo que sugiere la activación del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico en respuesta al deseo por la droga (Volkow et al., 2009).

Asimismo, la administración de una dosis aguda no-contingente o dosis repetidas de cocaína, morfina, opioides, nicotina y alcohol incrementan la fuerza sináptica de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas del ATV (Saal et al., 2003; Ungless et al., 2001) mediante un mecanismo dependiente de glutamato. Además, estudios de electrofisiología demostraron un incremento en las corrientes AMPA/NMDA en el ATV inducido por la administración de cocaína, lo cual estaría asociado a la inducción de LTP por la droga a través de un mecanismo dependiente de receptores NMDA, y asociado al incremento en la expresión de receptores AMPA (Kauer & Malenka, 2007).

Consistente con un papel crítico de la neurotransmisión excitatoria en la sensibilización, la administración sistémica y repetida de cocaína incrementa la liberación de glutamato (Glu) extracelular en el NA core de animales sensibilizados (Pierce et al., 1996; Reid & Berger, 1996). Este aumento en los niveles extracelulares de Glu inducido por cocaína, consta de dos etapas. Un aumento temprano de Glu en NA proveniente de su liberación vesicular, que ocurre dentro de los primeros 40 min luego de la administración de la droga, y está asociado al incremento de la actividad locomotora de los animales, y, por lo tanto, acompaña a la expresión de la sensibilización conductual. Mientras que, una liberación tardía de Glu en el NA de origen no vesicular ocurre luego de aproximadamente 3 h de la administración de la droga, (Pierce et al., 1996), asociada con alteraciones en el transportador de Glu neuronal y glial (Kauer & Malenka, 2007) inducidas por la cocaína. La activación de las proyecciones provenientes desde Cpf dorsal (**Figura 1**) hacia el NA son la principal fuente responsable del aumento de glutamato extracelular evocado por la cocaína en ratas sensibilizadas (Y. Li & Wolf, 1997; Pierce & Kalivas, 1997). A nivel postsináptico, por otra parte, la administración de psicoestimulantes, como cocaína, incrementan la expresión de receptores AMPA de superficie en el NA (Boudreau & Wolf, 2005; Ferrario et al., 2010; Pierce & Kalivas, 1997), y el bloqueo de estos receptores tiene un rol importante durante la expresión de la sensibilización conductual (M. E. Wolf & Ferrario, 2010). En este sentido, luego de un periodo de abstinencia a cocaína, se reportó en ratas sensibilizadas un incremento en las corrientes AMPA/NMDA luego de la reexposición a cocaína en el NA, asociado a la mayor expresión de receptores AMPA (M. E. Wolf & Ferrario, 2010). De esta manera, la sensibilización puede inducir cambios en los patrones de conectividad sináptica en los sistemas de recompensa del cerebro (Pierce & Kalivas, 1997), que son similares a los descritos en otros sistemas neuronales asociados con otras formas de plasticidad

dependiente de la experiencia (Malenka & Bear, 2004; Robinson & Berridge, 2001; Robinson & Kolb, 1997, 1999a).

Otras neuroadaptaciones acompañan a la sensibilización, y están asociadas con capacidad de algunas drogas, como los psicoestimulantes (cocaína y anfetaminas), para inducir modificaciones estructurales persistentes en la morfología de las neuronas del NA, así como también de la CPf (Robinson & Kolb, 1997, 1999a). En esta línea, se describió que el tratamiento repetido con psicoestimulantes incrementa el largo dendrítico en las MSNs del NA y de las neuronas piramidales de la CPf, mientras que, el tratamiento intermitente con numerosas drogas como cocaína, morfina y anfetaminas promueve la reorganización dendrítica y el incremento en la densidad de espinas dendríticas en estas áreas neuronales (Robinson & Berridge, 1993, 2001, 2008; Robinson & Kolb, 1997, 1999b, 1999a, 2004).

De esta manera, las drogas adictivas sensibilizan áreas neuronales involucradas en el procesamiento de incentivo, la motivación y la recompensa, y son estas neuroadaptaciones las encargadas de mediar la recompensa y el incremento en el valor del incentivo que adquieren las drogas con el uso repetido (Robinson & Berridge, 1993). Por lo tanto, el modelo de sensibilización permite estudiar no solo los comportamientos asociados a las drogas, sino también las propiedades motivacionales y las neuroadaptaciones celulares que acompañan la administración repetida de las mismas. Así la investigación preclínica podría contribuir a descifrar los fundamentos neurobiológicos que acompañan la adicción a las drogas y su recaída luego de largos periodos de abstinencia (Nestler & Aghajanian, 1997; White & Kalivas, 1998).

### **Sensibilización cruzada entre estrés y psicoestimulantes: sustratos neurobiológicos comunes**

La exposición a situaciones estresantes involucra la percepción de un evento dañino o amenazante y la posterior respuesta y adaptación a dicho evento (Folkman, 2013). Tanto la experiencia estresante como su respuesta, están asociadas a la activación de sistemas neurales específicos que, de manera compleja, interactúan para coordinar la experiencia y una respuesta al evento estresante (Sinha, 2001). Brevemente, la exposición a estrés, induce la liberación del factor de liberación de corticotrofina (CFR), el cual activa el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) y promueve la liberación de glucocorticoides, desencadenando una cascada de eventos a nivel central y periférico para dar respuesta al estrés (López et al., 1999). Dicha liberación de CRF a nivel central,

además, promueve la activación de las neuronas dopaminérgicas del ATV incrementando la liberación de dopamina mesolímbica, lo cual contribuye a mejorar la adaptación a eventos estresantes (López et al., 1999; Sinha, 2001).

Los modelos animales de estrés, a menudo, se basan en la exposición de los animales a una o más situaciones o estímulos de manera forzada, los cuales, en situaciones normales serían evitados por el animal (L. Lu et al., 2003; P. V. Piazza & Moal, 1998). Entre los estresores utilizados en modelos animales de adicción, se pueden mencionar aquellos estresores que involucran la exposición del animal a un ambiente aversivo, como los estresores de inmovilización, la exposición a shock eléctrico en las patas, el pinchazo en la cola y la derrota social. Otros estresores incluyen la manipulación del entorno, importante para mantener al animal en condiciones fisiológicas y psicológicas estables, como por ejemplo la restricción de comida, el aislamiento social y la separación materna (L. Lu et al., 2003).

La comorbilidad clínica existente entre los trastornos por estrés y los trastornos desencadenados por el uso de sustancias (SUDs en inglés “*substance use disorders*”) llevó a sugerir que los factores ambientales pueden tener un efecto importante en la sensibilidad individual sobre el consumo de drogas de abuso (Boden et al., 2012; Sinha, 2001, 2008). En este sentido, numerosos estudios sugirieron que las experiencias estresantes incrementan el consumo de opioides (Kosten et al., 1986; O’Doherty, 1991) y psicoestimulantes (Gawin, 1980), así como también aumentan el riesgo de sufrir recaída (Sinha, 2007). Apoyando estas observaciones, estudios en animales reportaron que el estrés repetido por pinchazo en la cola induce sensibilización a los efectos estimulantes motores de una posterior inyección de anfetamina (Antelman et al., 1980), mientras que la restricción de comida incrementa la respuesta conductual sensibilizada a psicoestimulantes (Cabib et al., 2000), así como también, el estrés por derrota social (Covington & Miczek, 2001), y estrés por separación materna (Meaney et al., 2002). En tanto, la exposición a estrés agudo o crónico por inmovilización incrementa las propiedades gratificantes y estimulantes motoras de anfetamina, cocaína (Díaz-Otañez et al., 1997; Esparza et al., 2012; Garcia-Keller et al., 2013; Kalivas & Duffy, 1990; Pacchioni et al., 2002, 2007) y morfina (Capriles & Cancela, 1999; Shaham et al., 1992). Por lo tanto, la exposición a estrés puede mejorar la capacidad de respuesta conductual y neuronal a las drogas, fenómeno denominado sensibilización cruzada (Antelman et al., 1980; Garcia-Keller et al., 2013; Hahn et al., 1986; Herman et al., 1984; Leyton &

Stewart, 1990; MacLennan & Maier, 1983; Pacchioni et al., 2002; Robinson et al., 1985; Sorg, 1992).

A nivel neurobiológico la sensibilización cruzada entre el estrés y el consumo de drogas, está asociada a la activación de sustratos neuronales específicos que median las respuestas a estrés, así como también el incremento en la AA de drogas. Específicamente, se propuso que el estrés puede desencadenar la activación de áreas neuronales e incrementar la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica en regiones mesolímbicas y mesocorticales implicadas en la motivación y la recompensa (Kalivas & Duffy, 1989; Klawonn & Malenka, 2018; P. V. Piazza & Le Moal, 1996). En esta línea, estudios de microdiálisis en animales despiertos reportaron que la exposición a diferentes estresores, por ejemplo, estrés por derrota social o estrés por inmovilización incrementan la liberación de DA en NA y CPf media (Morrow & Roth, 1996; Tidey & Miczek, 1996). Mientras que, el estrés por inmovilización o el pinchazo en la cola incrementa la liberación de Glu en las terminales mesocorticolímbicas de la CPf media (Bagley et al., 1997; Gilad et al., 1990; Jedema & Moghaddam, 1994; Takahata & Moghaddam, 1998). Además, la exposición a estrés agudo incrementa la relación de las corrientes AMPA/NMDA en las sinapsis del ATV (Saal et al., 2003), sugiriendo que, al igual que las drogas, el estrés sensibiliza las neuronas dopaminérgicas del ATV frente a la liberación de Glu (Saal et al., 2003). Es decir que, tanto el estrés como las drogas de abuso comparten mecanismos adaptativos de plasticidad dependientes de la experiencia que impactan directamente en las neuronas dopaminérgicas del ATV, sugiriendo la existencia de un sustrato neuronal en común entre las drogas y el estrés (Kalivas & Stewart, 1991; P. V. Piazza & Moal, 1998). En este sentido, reportes previos de nuestro laboratorio revelaron que la sensibilización conductual a anfetamina inducida por la exposición aguda a estrés por inmovilización potencia la liberación de DA en el NA y estriado, 24 h después la exposición a la droga (Pacchioni et al., 2002, 2007), mientras que la exposición a cocaína incrementa los niveles extracelulares de DA en NA core, 21 días después de la exposición a un único estresor (Garcia-Keller et al., 2013). Además, nuestro laboratorio reportó que una única exposición a estrés por inmovilización es capaz de inducir cambios a largo plazo en las proyecciones de las neuronas glutamatérgicas que inervan el NA core, facilitando la adquisición de la conducta de AA de cocaína (Garcia-Keller et al., 2016), apoyando la idea de que la plasticidad de neuronas glutamatérgicas que provienen de

regiones corticales e inervan el NA contribuyen al efecto del estrés en el consumo de drogas.

De esta manera, el estrés y las drogas de abuso incrementan la actividad de la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica a nivel mesocorticolímbico, particularmente en el NA proporcionando un posible mecanismo de interacción implicado en la base neuronal de la sensibilización cruzada entre estrés y drogas.

### **Participación de los receptores AMPA en la expresión de la sensibilización conductual inducida por estrés o psicoestimulantes**

Las MSNs del NA reciben aferentes glutamatérgicas de regiones límbicas y corticales. Estas aferencias transmiten información relacionada con la relevancia emocional (Amígdala), el contexto (Hipocampo) y la planificación ejecutiva y motora de la conducta (Corteza prefrontal, CPf). Las MSNs integran esta información y luego, a través de sus proyecciones, envían la información a las regiones motoras que ejecutan el comportamiento dirigido a objetivos (Groenewegen et al., 1999; Kelley, 1999). Por este motivo, numerosos trabajos sugirieron que el NA es el área involucrada en la traducción de los eventos motivacionalmente relevantes en acciones (Kalivas & O'Brien, 2008; Klawonn & Malenka, 2018; Mogenson et al., 1987). Las entradas de glutamatérgicas incrementan la excitabilidad de las MSNs del NA principalmente a través de la activación de receptores AMPA (Hu & White, 1996; Pennartz et al., 1990). Numerosa evidencia obtenida de modelos animales de adicción indica que la búsqueda de cocaína requiere, en última instancia, la activación de las MSNs del NA a través de receptores de glutamato de tipo AMPA. En este sentido, algunos trabajos reportaron que la inyección de antagonistas de AMPA en el NA bloquea la búsqueda de cocaína inducida por claves asociadas con la droga (Conrad et al., 2008), así como también la búsqueda de cocaína en modelos AA que utilizan una razón fija de refuerzo de segundo orden (Di Ciano & Everitt, 2001, 2004), la reinstalación inducida por claves (Bäckström & Hyttiä, 2007) y la reinstalación inducida por la droga (Cornish & Kalivas, 2000; Famous et al., 2008). Mientras que, la infusión de AMPA en el NA restablece la búsqueda de cocaína después de la extinción (Cornish et al., 1999; Cornish & Kalivas, 2000; Kruzich & Xi, 2006; Suto et al., 2004). De esta manera, se sugirió que la transmisión de receptores AMPA, tanto en el NA core como en el Shell, desempeñan un papel importante en la búsqueda de cocaína, aunque en el NA core su participación sería más importante ya que media la búsqueda de cocaína inducida por claves.



Una característica interesante observada en los modelos animales de adicción es que es que las respuestas conductuales a la cocaína y las claves asociadas a la droga se fortalecen en animales con una experiencia previa con la cocaína. Lo cual, llevó a proponer que el fortalecimiento observado podría estar mediado por el incremento de receptores AMPA en las sinapsis del NA y esta adición de receptores en la sinapsis podría preparar las neuronas para responder de manera más robusta al glutamato liberado por las aferencias corticales y límbicas en respuesta a la droga y a claves asociadas con las drogas. Por lo que esta respuesta incrementada al Glu, y regulada por la transmisión de receptores AMPA, podría ser uno de los mecanismos involucrados en la búsqueda de cocaína y, por consiguiente, en la plasticidad a largo plazo inducida por la cocaína en el NA (Anderson et al., 2008; Bobadilla et al., 2017; Gipson, Kupchik, et al., 2013).

La participación de la transmisión glutamatérgica en el NA durante la expresión de la sensibilización se demostró por primera vez a través del bloqueo de los receptores AMPA con un antagonista (CNQX) en el NA (Pierce et al., 1996). En este trabajo, Pierce y col (Pierce et al., 1996) demostraron que la infusión de CNQX en el NA de ratas sensibilizadas a cocaína era capaz de prevenir la expresión de la sensibilización conductual inducida por la administración no-contingente de la droga, luego de 21 días de abstinencia, sin afectar la respuesta conductual de ratas no sensibilizadas que fueron expuestas a una dosis aguda de cocaína, sugiriendo, que la transmisión mediada por receptores AMPA en el NA era necesaria para la expresión de la sensibilización locomotora en ratas sensibilizadas luego de un periodo de abstinencia. Además, en este trabajo se estableció un rol diferencial del subcompartimiento core del NA en la expresión de conductas relacionadas con la adicción. En esta línea, se demostró que la cocaína induce la liberación de Glu en core, y pero no en shell, de animales sensibilizados a cocaína que expresaron sensibilización psicomotora (Pierce et al., 1996). De esta manera, este trabajo fue el primero en demostrar que la transmisión mediada por receptores AMPA juega un rol importante en la expresión de la sensibilización conductual en el NA core de animales con una experiencia previa con la droga.

El tráfico de receptores de AMPA dentro y fuera de la sinapsis es un mecanismo importante que regula la fuerza sináptica de varios tipos de plasticidad, incluida la LTP (Bredt & Nicoll, 2003; Malinow & Malenka, 2002; Turrigiano & Nelson, 2004). En este sentido, la composición de la subunidad del receptor juega un papel importante en la determinación de la función del receptor AMPA durante la plasticidad, ya que los

receptores AMPA compuestos por subunidades con extremos C-terminales cortos, como los GluR2/3 entran y salen de las sinapsis de forma constitutiva, mientras que los receptores AMPA que contienen una subunidad con un extremo C-terminal largo, como GluR1 se insertan en las sinapsis de una manera dependiente de la actividad (Malinow & Malenka, 2002). Reportes de Boudreau y Wolf (Boudreau & Wolf, 2005) enfocados en el estudio de la regulación directa del tráfico de receptores AMPA *in vivo*, luego del tratamiento con cocaína, establecieron una estrecha relación entre la sensibilización locomotora y el incremento en la expresión de receptores AMPA luego de transcurridos entre 14 y 21 días de abstinencia, pero no así, al primer día de abstinencia o 41 días después. En este sentido, estos autores reportaron un incremento en la expresión de receptores AMPA subunidad GluR1 y GluR2 solo en animales previamente sensibilizados con cocaína que mostraron un incremento en la actividad locomotora, vinculando el incremento de receptores AMPA con la expresión de la sensibilización psicomotora. Además, este trabajo correlacionó positivamente la magnitud de la sensibilización locomotora con la proporción de receptores AMPA GluR1 y GluR2 de superficie expresados en el NA, sugiriendo que la magnitud del fenómeno de sensibilización conductual depende en parte de la cantidad de receptores expresados en la superficie de las MSNs del NA (Boudreau et al., 2009; Boudreau & Wolf, 2005). Estos hallazgos se correlacionan con las observaciones previamente descritas por Pierce y col (Pierce et al., 1996), quienes reportaron que ratas sensibilizadas a la cocaína mostraron un incremento mayor en la actividad locomotora frente a la infusión de AMPA en NA después de 2 a 3 semanas de abstinencia, respecto de ratas no sensibilizadas a la droga (Pierce et al., 1996). Estudios posteriores de Wolf y Ferrario (M. E. Wolf & Ferrario, 2010) demostraron que la re exposición a cocaína en animales previamente sensibilizados con la droga, conduce a un incremento en la expresión de receptores AMPA subunidad GluR1 y GluR2, 30 min después de la inyección de la droga, y esto se encuentra relacionado con el incremento en la sensibilización locomotora de los animales (M. E. Wolf & Ferrario, 2010). De esta manera, estos trabajos establecen una estrecha asociación entre la expresión de la sensibilización conductual y la magnitud de la respuesta conductual, con el tráfico de receptores AMPA en la sinapsis del NA, lo cual plantea la posibilidad de que las alteraciones en el tráfico de receptores AMPA en la postsinapsis glutamatérgica inducidas por la cocaína constituyan un mecanismo molecular involucrado en los cambios a largo plazo que median las alteraciones conductuales en la

adicción a cocaína y, por lo tanto la plasticidad a largo plazo inducida por la cocaína en el NA.

En concordancia con estas observaciones, estudios electrofisiológicos reportaron un incremento en el radio de las corrientes AMPA/NMDA en las sinapsis excitatorias de NA shell en animales previamente sensibilizados con cocaína, luego de 10 a 14 días de abstinencia (Kourrich et al., 2007). Aunque cabe destacar que este incremento en el radio pudo estar dado por cambios en la función de ambos tipos de receptores, el precedente aumento de receptores AMPA en superficie durante la sensibilización conductual a cocaína, permite inferir que este cambio está mediado por el incremento en el número y la función de los receptores AMPA en la sinapsis de NA (Kourrich et al., 2007). De esta manera, la abstinencia de cocaína induce cambios en la excitabilidad de las MSNs a través de la expresión de receptores AMPA en el NA y estas alteraciones estarían implicadas en las conductas asociadas con la búsqueda de cocaína. En este sentido, Suto y col (Suto et al., 2004) reportaron que la infusión de AMPA en el NA restablece la búsqueda de cocaína en ratas previamente sensibilizadas con la droga (Suto et al., 2004), por lo cual la ejecución motora de la búsqueda de cocaína y la reinstalación de la conducta dependen de la activación de las aferentes corticales glutamatérgicas que inervan el NA a través de la activación de receptores AMPA, sugiriendo que el incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie en el NA es un mecanismo importante en la sensibilización, así como también en la vulnerabilidad asociada al restablecimiento de la búsqueda de drogas (Boudreau & Wolf, 2005).

Reportes de nuestro laboratorio, en el estudio de la comorbilidad entre el estrés y el consumo de cocaína, demostraron que la infusión de CNQX en NA core 21 días después del estresor, previene la expresión sensibilización cruzada a cocaína inducida por una única exposición a estrés por inmovilización, sugiriendo que la participación de la transmisión glutamatérgica se extiende al efecto de cocaína en animales previamente expuestos a estrés agudo por inmovilización (Garcia-Keller et al., 2013). Además, el incremento en la actividad locomotora inducida por una dosis de cocaína en ratas sensibilizadas por la exposición a estrés agudo, se vinculó con el aumento en la expresión de receptores AMPA de superficie subunidad GluR1 en el Core, pero no en Shell (Garcia-Keller et al., 2013), destacando el rol diferencial del Core durante la expresión de la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína y la implicancia del incremento de receptores AMPA en este subcompartimiento del NA. Apoyando estas observaciones a

través de estudios electrofisiológicos, se estableció que la exposición a estrés agudo por inmovilización conduce a un incremento en las corrientes AMPA/NMDA en NA core, 21 días después del estresor (Garcia-Keller et al., 2016), similar a los cambios observados en animales expuestos a un régimen de cocaína luego de un periodo de abstinencia, lo cual llevó a concluir que la exposición a estrés a través del tráfico de receptores AMPA en las sinapsis del NA core y el incremento en la excitabilidad de las MSNs, recapitula algunos de los mecanismos que sustentan la sensibilización a cocaína en el NA core. En un trabajo posterior de nuestro laboratorio, además se demostró que durante la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por la exposición a estrés crónico de inmovilización, se produce un incremento en la expresión de receptores AMPA que contienen la subunidad GluR1 (AMPA GluR1) de superficie en NA core, 45 min después de una dosis aguda de cocaína e involucra el remodelado del citoesqueleto de actina (Esparza et al., 2012), vinculando de esta manera los cambios a largo plazo en el NA core con alteraciones en la dinámica de actina que impactan en la expresión de receptores AMPA de superficie.

En síntesis, el aumento en la expresión del receptor glutamatérgico de tipo AMPA en el NA representa una importante adaptación molecular por la cual las drogas de abuso y el estrés inducen cambios en la función de la vía meocorticolímbica y median las alteraciones conductuales a largo plazo en la sensibilización.

## MODELO DE AUTOADMINISTRACIÓN DE DROGAS

### **Autoadministración**

El estudio de las drogas como reforzadores en animales de experimentación reveló que los roedores son capaces de auto administrarse casi todas las drogas que resultan ser adictivas en humanos (Yokel, 1987), como por ejemplo opioides y psicoestimulantes. Por lo cual, el desarrollo de modelos de AA de drogas en el laboratorio, permite modelar algunos de los comportamientos de consumo de drogas observados en humanos (Katz, 1990; Markou et al., 1993).

El condicionamiento operante utilizado en el modelo de AA está basado en el consumo voluntario de la droga de interés con el objetivo de evaluar el refuerzo positivo de la droga (Weeks, 1962). De esta manera, el aprendizaje de una respuesta operante, como presionar una palanca, da como resultado la infusión intravenosa de la droga o la

entrega para su consumo oral, y los cambios en la tasa de la respuesta reforzada por la droga reflejan los cambios en la sensibilidad a sus propiedades apetitivas (Altman et al., 1996; Schuster & Thompson, 1969).

Tres enfoques pueden ser utilizados en el estudio de la AA de drogas, con el objetivo de modelar con mayor precisión los patrones de consumo de las mismas. Éstos involucran estudios de adquisición de la conducta de AA, el mantenimiento y por último la reinstalación de la conducta. Los estudios de adquisición evalúan la propensión de los animales para autoadministrarse la droga, basados en los primeros contactos que tiene el sujeto con la droga a dosis bajas y controladas, y tienen en cuenta el umbral o la tasa de adquisición (P. V. Piazza & Le Moal, 1996; P. V. Piazza & Moal, 1998). Los estudios de mantenimiento de la conducta de AA requieren de un entrenamiento prolongado a altas dosis de la droga y permiten estimar los cambios en la sensibilidad a los efectos reforzantes de las drogas y la motivación para consumirlas (Altman et al., 1996; Schuster & Thompson, 1969). Requieren de esquemas de razón progresiva en donde la dosis se mantiene constante y el número de respuestas necesarias para obtener una infusión de droga se incrementa progresivamente, hasta alcanzar el punto de quiebre. Por último, la etapa de reinstalación, permite evaluar la recaída en el consumo de la droga y se evalúa luego de la extinción de la conducta adquirida previamente. Además, la presencia de estímulos asociados al consumo de la droga puede desencadenar el deseo por la misma durante periodos de abstinencia conduciendo a la reinstalación de la conducta de AA (P. V. Piazza & Moal, 1998).

Uno de los paradigmas más utilizados de AA consta de sesiones diarias de accesos cortos a la droga, generalmente de 1 a 3 h de duración. Estas sesiones muestran, de manera confiable, el aumento en el consumo de la droga y el restablecimiento de la conducta de búsqueda de drogas, dos características relevantes observadas en personas que desarrollan adicciones. Sin embargo, algunos autores consideran que, a pesar de que permiten evaluar el consumo de drogas, no evalúan el comportamiento involucrado en la transición a la adicción (Ahmed & Koob, 1998). Por lo cual, el uso de este paradigma sólo podría abordar el uso de drogas recreativas, y no la escalada al consumo compulsivo descrito en humanos (Roberts et al., 2007). Un abordaje a esta limitación, es el paradigma de AA de accesos a la droga por tiempos prolongados, que consta de sesiones diarias con un mínimo de 6 h (Ahmed & Koob, 1998), que pueden llegar a durar hasta 12 h (Cocker et al., 2019; Lucantonio et al., 2015). En comparación con las sesiones de

tiempos más cortos, estos paradigmas permiten observar una escalada en el comportamiento de consumo de la droga (Ahmed & Koob, 1998; Mandt et al., 2015; Mantsch et al., 2004), una mayor motivación por el consumo de la droga, por ejemplo, con psicoestimulantes como cocaína (Hao et al., 2010; Paterson & Markou, 2003), así como también una mejora en el comportamiento de búsqueda de droga (Knackstedt & Kalivas, 2007; Mantsch et al., 2004).

Otra característica interesante descrita en la adicción a psicoestimulantes en personas es que el consumo suele producirse de forma intermitente. En este sentido, los consumidores ingieren grandes cantidades de cocaína en cortos periodos de tiempo, seguido de un periodo libre de droga, antes de consumirla nuevamente (Allain et al., 2015). Por lo cual, el patrón temporal de administración de la droga juega un papel fundamental en la transición a la adicción. El paradigma conductual de AA de acceso intermitente, simula este tipo comportamiento en roedores permitiendo el acceso a la droga durante periodos de 5 min, separados por periodos libres de droga de 25 min (Zimmer et al., 2011). De esta manera, se observa un alto nivel de consumo durante los periodos de disponibilidad de la droga (Allain et al., 2018) y fluctuaciones en los niveles de concentraciones cerebrales de cocaína (Zimmer et al., 2012), mientras que además los animales muestran mayor motivación para conseguir la droga comparado con aquellos paradigmas de corto acceso o acceso prolongado (Zimmer et al., 2012).

Numerosas neuroadaptaciones están asociadas con la regulación de la respuesta conductual durante la AA de drogas. En primer lugar, las exposiciones iniciales a la droga durante la etapa de adquisición, impactan principalmente en la CPf impulsando el comportamiento dirigido a un objetivo, así como también en regiones mesolímbicas, incluyendo el NA, las cuales son regiones claves en la integración del reforzamiento por estímulos (Hopf & Lesscher, 2014). A medida que se desarrolla la formación de la conducta de autoadministración, el cuerpo estriado dorsal desempeña un papel importante en el mantenimiento de la ingesta de la droga (Belin & Everitt, 2008). Asimismo, en lo que respecta a los paradigmas de AA que constan de sesiones de tiempos cortos o acceso prolongado, los mecanismos neurobiológicos que median el comportamiento como resultado de estos dos paradigmas de entrenamiento parecen diferir, específicamente con respecto a la neuroplasticidad dentro del estriado (Ducret et al., 2016; Purgianto et al., 2013), ya que si bien el estriado se encuentra implicado en la búsqueda de drogas, la

participación del estriado dorsal es prominente durante la búsqueda compulsiva de la droga.

### **Rol del estrés en la adquisición de la conducta de autoadministración**

Evidencias clínicas sugieren que uno de los principales factores que influyen en el desarrollo de adicciones, después del primer contacto con la droga, o de su uso esporádico, es la vulnerabilidad que presentan algunos individuos a los efectos reforzantes de las drogas (O'Brien et al., 1986; P. V. Piazza & Le Moal, 1996). El paradigma de adquisición de la conducta de AA permite evaluar estas diferencias individuales, a través de la propensión que presentan los animales para adquirir la conducta de consumo de drogas, bajo condiciones experimentales estables, en donde los animales tienen el mismo acceso a la droga, en dosis bajas, y en idénticas condiciones ambientales (Johanson & Fischman, 1989).

La investigación acerca de la influencia del estrés en el consumo de drogas, contribuyó a demostrar que el estado biológico del individuo juega un papel importante en la propensión para desarrollar la conducta de AA de drogas, destacando la importancia de las experiencias ambientales para inducir un fenotipo vulnerable.

Numerosos estresores pueden promover la facilitación de la adquisición de la conducta de AA de drogas de abuso. Por ejemplo, la adquisición de AA de cocaína y anfetaminas es facilitada por la exposición de los animales a factores estresantes físicos como el pinchazo repetido en la cola del animal y el shock eléctrico en las patas (Goeders & Guerin, 1994). La restricción de comida, otro estresor físico, facilita la adquisición de la conducta de AA de alcohol, opiáceos y psicoestimulantes (P. V. Piazza et al., 1990). En esta misma línea, la exposición de ratas macho a regímenes de jerarquía social facilita la adquisición de la AA de psicoestimulantes (Haney et al., 1995; Maccari et al., 1991; P. V. Piazza et al., 1990, 1991; Taylor et al., 1987), mientras que el aislamiento social puede facilitar la adquisición de la AA de morfina (Hadaway et al., 1979; Marks-Kaufman & Lewis, 1984), heroína y la AA oral de alcohol (Horger et al., 1990; Wolffgramm & Heyne, 1991). En tanto, la exposición a situaciones de estrés prenatal durante la tercera y cuarta semana de gestación, aumenta la probabilidad de que ratas adultas desarrollen AA de anfetaminas (Deminière et al., 1992).

Una consideración importante durante los esquemas de adquisición es que numerosos factores pueden influenciar la respuesta conductual a estresores aumentando la propensión del animal para autoadministrarse una droga. Por ejemplo, la previsibilidad

de un estímulo para evocar un efecto interno no deseado y la intensidad del estresor son factores importantes que pueden modificar la AA de drogas. En este sentido, el estrés inducido por descargas eléctricas en las patas del animal aumenta la AA de cocaína, sin embargo, se observó que si el estresor es previamente predecible no altera la conducta de consumo (Goeders & Guerin, 1994). Además, otros estudios sugirieron que la exposición a estresores físicos de manera aguda, como por ejemplo, la exposición del animal a descargas eléctricas en las patas o la colocación del animal sobre una plancha caliente, no altera la AA de cocaína, posiblemente porque estos estresores necesitan ser más intensos para evocar una respuesta conductual (Ramsey & Van Ree, 1993). Asimismo, reportes de nuestro laboratorio demuestran que la exposición a estrés agudo por inmovilización induce neuroadaptaciones a nivel de las sinapsis glutamatérgicas de NA que acompañan la facilitación observada en la adquisición de la conducta de AA de cocaína (Garcia-Keller et al., 2016).

La exposición a estresores de manera más prolongada puede facilitar la AA de drogas, tanto si son aplicados de manera continua (Alexander et al., 1981; Maccari et al., 1991; Schenk et al., 1987, 1990) como si son administrados repetidamente con una duración menor (Goeders & Guerin, 1994; Haney et al., 1995; Miczek & Mutschler, 1996; P. V. Piazza et al., 1990; Shaham & Stewart, 1994). Sin embargo, el tiempo transcurrido entre el evento estresante y la exposición a la droga puede ser otro factor que influencia el consumo. Por ejemplo, en el caso de la facilitación de la AA inducida por exposición a estrés por restricción, algunos autores sugieren que sólo se observa si la exposición a la droga ocurre poco tiempo después de la exposición al estresor (Shaham, 1993). Sin embargo, otros autores describieron la facilitación de la AA de drogas tanto cuando el estresor continúa durante el período de AA (Bozarth et al., 1989; Hadaway et al., 1979; Marks-Kaufman & Lewis, 1984; Schenk et al., 1990; Wolffgramm & Heyne, 1991) como cuando el estrés termina semanas antes del inicio de las sesiones de la AA (Haney et al., 1995; Maccari et al., 1991; P. V. Piazza et al., 1990; Specker et al., 1994).

Por lo cual, si bien tanto la exposición aguda o crónica a estrés incrementan las propiedades reforzantes de las drogas, existen factores que pueden influenciar la respuesta conductual de los animales modificando la propensión de los mismos para adquirir la conducta de AA de drogas y deben ser tenidos en cuenta cuidadosamente en el estudio del estrés y la sensibilidad a drogas de abuso (Engeln et al., 2020).



## **PLASTICIDAD ESTRUCTURAL Y SINÁPTICA ASOCIADA A ESTRÉS Y PSICOESTIMULANTES**

Las neuronas son unidades integradoras que reciben información de una red de neuronas y generan a cambio potenciales de acción, que dan como resultado una comunicación dinámica entre conjuntos neuronales (Buzsáki, 2010). Esta actividad coordinada entre neuronas tiene lugar en las sinapsis, la cual es principalmente un punto unidireccional de transmisión de la información en el cerebro entre un axón terminal presináptico, que entrega una señal que es recibida, y el compartimiento postsináptico, que propaga la información recibida (Buzsáki, 2010).

Nuestra capacidad para procesar e incorporar información depende de los mecanismos de plasticidad sináptica (A. Holtmaat & Svoboda, 2009). La desregulación de la plasticidad sináptica se encuentra implicada en una variedad de trastornos psiquiátricos (Penzes et al., 2011; Russo et al., 2009), trastornos neurológicos (Sheng & Kim, 2011) y en el deterioro cognitivo relacionado con la edad (Dumitriu et al., 2010). Además, las experiencias de vida, como la exposición a estrés físico o psicológico de manera prolongada o el consumo de psicoestimulantes, pueden causar cambios en la conectividad sináptica que resulta en alteraciones patológicas en las conexiones de circuitos neuronales (Christoffel, Golden, & Russo, 2011; S. A. and Golden & Russo, 2012; Montagud-Romero et al., 2018).

### **Generalidades de las espinas dendríticas**

La plasticidad sináptica a nivel excitatorio, ocurre principalmente en pequeñas protuberancias de la dendrita llamadas espinas (Hering & Sheng, 2001). Las espinas dendríticas son especializaciones morfológicas que sobresalen del eje principal de las dendritas neuronales. Normalmente presentan una longitud de entre 0.5 y 2  $\mu\text{m}$ , mientras que se encuentran presentes en una densidad lineal que varía entre 1 a 10 espinas por  $\mu\text{m}$  de longitud dendrítica en neuronas maduras (Chicurel & Harris, 1992; Harris, 1994; Sorra & Harris, 2000). La mayoría de las sinapsis excitatorias en mamíferos ocurren en las espinas dendríticas, y una espina madura típica tiene una sola sinapsis situada en su cabeza. Por lo cual, las espinas dendríticas representan el compartimiento postsináptico unitario principal de la transmisión excitatoria (Hering & Sheng, 2001), así como también el sitio de los cambios plásticos dependientes de la experiencia (Robinson & Kolb, 2004).

La actina es el principal componente estructural de las espinas dendríticas. Los cambios morfológicos rápidos en las espinas dendríticas dependen del grado de polimerización de actina e involucran el desplazamiento de actina monomérica (G-actina) a actina filamentosa (F-actina) (Fukazawa et al., 2003; Star et al., 2002). Así, F-actina es el principal componente postsináptico estructural, y el ensamblado y desensamblado, conocido como dinámica de actina, controla la morfología de las espinas dendríticas en respuesta a cambios en la actividad sináptica. A grandes rasgos, el crecimiento de las espinas durante la inducción del LTP está asociado a una mayor fuerza sináptica, y depende del ensamblado y estabilización de F-actina, mientras que la retracción de espinas y su eliminación inducida por una baja frecuencia de estimulación requiere el desensamblado de F-actina (Harris, 1994; Hering & Sheng, 2001; Sorra & Harris, 2000). En condiciones de reposo, se pueden encontrar dos “pools” de actina en las espinas dendríticas: un “pool” altamente dinámico ubicado en la cabeza de la espina y otro “pool” estable en la base de la espina. Después de la inducción de LTP, un tercer “pool” de actina aparece en la espina para permitir el agrandamiento de la misma, y este “pool” parece ser el responsable del crecimiento de la espina durante el LTP (Honkura et al., 2008; Matsuzaki et al., 2004). De esta manera, la arquitectura dinámica de la espina se mantiene mediante la polimerización y depolimerización de los filamentos de actina en la cabeza de la espina y la morfología de las espinas dendríticas es un factor importante en la conectividad funcional dentro de los circuitos neuronales, ya que está altamente correlacionada con la función sináptica (Y. Chen et al., 2004; Yuste & Bonhoeffer, 2001). Por otro lado, la distribución F-actina a nivel presináptico, enfatiza un papel de la dinámica de actina en el reclutamiento de vesículas sinápticas y en procesos de exocitosis o endocitosis (Hering & Sheng, 2001).

Otro componente estructural de las espinas dendríticas es la densidad postsináptica (PSD). La misma se ubica por debajo de la membrana postsináptica en la cabeza de las espinas dendríticas (Hering & Sheng, 2001; Sheng & Hoogenraad, 2007) y muestra una alta correlación con el tamaño de la cabeza de la espina y la zona activa asociada, así como también con la fuerza sináptica (Hering & Sheng, 2001; Sheng & Hoogenraad, 2007). La PSD contiene una alta concentración de proteínas estructurales, principalmente F-actina (Capani et al., 2001), y moléculas de señalización celular como la quinasa dependiente de calmodulina II (CaMKII), receptores glutamatérgicos (Moon et al., 1994), canales iónicos, moléculas de adhesión celular y proteínas de andamiaje

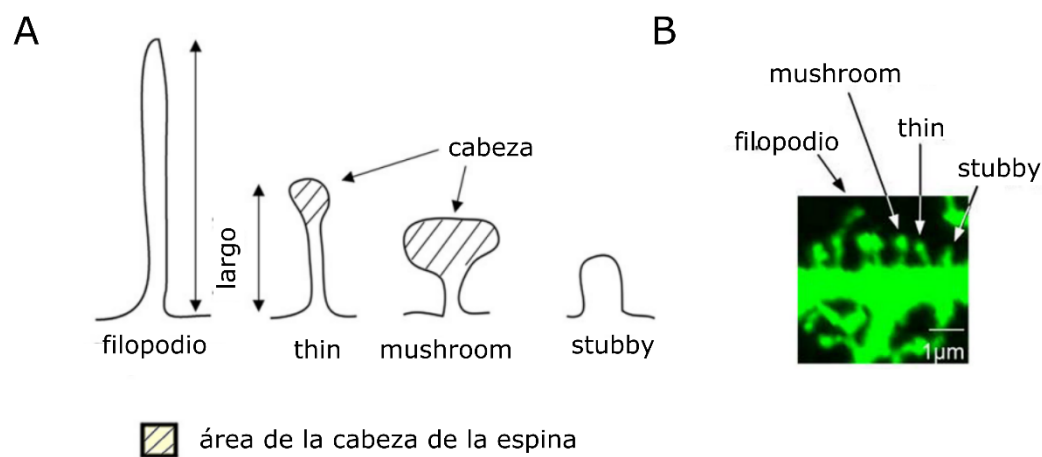
como PSD-95 (Cho et al., 1992; Sheng & Hoogenraad, 2007), sobre la cual se ensambla la PSD. El rol estructural de la PSD permite la localización y estabilización de los receptores glutamatérgicos y moléculas de adhesión en la membrana postsináptica, favoreciendo la adhesión sináptica y el alineamiento de los receptores con los sitios presinápticos de liberación del neurotransmisor. Además, tiene un rol importante en la señalización, ya que ensambla diferentes moléculas de señalización cerca de los receptores glutamatérgicos y permite que la activación del receptor esté eficientemente acoplada a las vías de señalización postsinápticas. El citoesqueleto de actina desempeña un papel importante en las actividades sinápticas que van desde la organización de la PSD (Sheng & Hoogenraad, 2007), y el anclaje de los receptores postsinápticos (Renner et al., 2008), a la facilitación del tráfico de las cargas sinápticas (Schlager & Hoogenraad, 2009) y la localización de la maquinaria de traducción (Bramham, 2008).

### **Cambios morfológicos y clasificación de las espinas dendríticas**

Los cambios en la morfología de las espinas constituyen un evento regular de la fisiología del cerebro y pueden originarse tanto en presencia de actividad sináptica de alta frecuencia como en respuesta a estímulos conductuales o fisiológicos. La formación de nuevas espinas así como el remodelado de las espinas preexistentes son importantes para establecer y modular los circuitos sinápticos durante el desarrollo y la plasticidad sináptica (Ehlers, 2000). La morfología de las espinas juega un papel crucial en las funciones cerebrales y contribuye a las adaptaciones conductuales inducidas por eventos motivacionales relevantes, tales como la exposición a situaciones estresantes y el consumo de psicoestimulantes (Blanpied & Ehlers, 2004; Kalivas & Volkow, 2005; McGee & Brecht, 2003; Robinson & Kolb, 1997).

En neuronas *in vivo*, la morfología de las espinas dendríticas cambia constantemente. El estudio de las espinas dendríticas en tejidos cerebrales fijados permitió clasificar las espinas dendríticas en tres categorías según sus diferencias morfológicas basadas en la relación entre la longitud total de la espina, el ancho del cuello y el ancho de la cabeza. De esta manera, las espinas pueden ser consideradas como: *mushroom*, *thin* o *stubby*, las cuales además de presentar características morfológicas diferentes, muestran diferencias en sus propiedades sinápticas (Chang & Greenough, 1984; Fifkova & Anderson, 1981; Harris et al., 1992; Peters & Kaiserman-Abramof, 1970) (**Figura 4**). Las espinas *stubby* se caracterizan por presentar una longitud total similar al diámetro de la cabeza y escasa o nula presencia de cuello. Estas espinas son

prominentes durante el desarrollo y se consideran estructuras inmaduras y plásticas fuertemente acopladas a su dendrita madre (Schmidt & Eilers, 2009). Este fuerte acoplamiento, sugiere que los cambios en la densidad de espinas tipo *stubby* pueden impactar desproporcionadamente en la excitabilidad neuronal en relación con otros tipos de espinas, ya que espinas con cuello pequeño pueden recibir menos o contener conexiones muy diferentes respecto de las espinas *mushroom* (Noguchi et al., 2005). Las espinas tipo *thin* poseen una longitud total mayor que el ancho de su cabeza, y este a su vez, es mayor que el ancho de su cuello. Se consideran estructuras inmaduras y plásticas, que pueden agrandarse y estabilizarse o contraerse, relativamente rápido en respuesta a nuevos estímulos (A. J. G. D. Holtmaat et al., 2005; Kasai et al., 2003). Las espinas tipo *mushroom* presentan un ancho de cabeza mayor al de su cuello y se caracterizan por ser estructuras estables, maduras y poco plásticas que persisten por meses y muestran una mayor densidad de receptores AMPA a lo largo de la PSD, respecto de las espinas *stubby* (S. A. and Golden & Russo, 2012), generando sinapsis funcionalmente más fuertes (Ganeshina et al., 2004; Matsuzaki et al., 2001; Yasuda et al., 2004).



**Figura 4. Clasificación morfológica de los diferentes tipos de espinas dendríticas. Imagen adaptada de Pontrello y Ethell (Pontrello & Ethell, 2009; H. Shen et al., 2009).** A) Dibujo representativo de los diferentes tipos de espinas dendríticas según sus características morfológicas. Se puede observar en primer lugar un filopodio el cual es un precursor en la formación de nuevas espinas, seguido de una espina *thin*, *mushroom* y *stubby*. B) Imagen a gran aumento de una dendrita de hipocampo en donde se encuentran señaladas las principales categorías de protuberancias dendríticas: *filopodio*, *thin*, *mushroom* y *stubby*.

Además de variar en forma y tamaño, las espinas pueden diferir en su contenido de gránulos y moléculas específicas. En general, las espinas más grandes tienen

proporcionalmente sinapsis más grandes, y contienen una mayor diversidad de orgánulos. En esta línea, la presencia de la PSD por debajo de la membrana postsináptica ubicada en la cabeza de la espina, permite la organización de receptores y la señalización de moléculas en la hendidura sináptica frente a los agrupamientos vesiculares de neurotransmisores a nivel presináptico (Hering & Sheng, 2001). Por lo cual, la cabeza de espina es proporcional al tamaño de la PSD, el número de receptores postsinápticos y al número de vesículas presinápticas, sugiriendo que el crecimiento de la cabeza de la espina probablemente se correlaciona con un fortalecimiento de la transmisión sináptica (S. A. and Golden & Russo, 2012; Hering & Sheng, 2001).

### **Plasticidad estructural y sináptica mediada por psicoestimulantes en el NA**

La reorganización o el fortalecimiento de las conexiones sinápticas en circuitos neuronales específicos o relevantes, acompañan los cambios conductuales asociados a la plasticidad dependiente de las experiencias (Robinson & Kolb, 2004).

La plasticidad estructural inducida por el consumo de psicoestimulantes puede ser caracterizada mediante la determinación de tres parámetros que involucran: (1) las alteraciones en la densidad total de las espinas dendríticas inducidas por el psicoestimulante, (2) la complejidad de la arborización dendrítica inducida por los psicoestimulantes, y (3) los cambios en el tamaño y la forma de las espinas dendríticas que determinan el aspecto morfológico de las mismas. En este sentido, es posible determinar con mayor precisión la relevancia funcional de la plasticidad dependiente de la experiencia (A. Holtmaat & Svoboda, 2009) al caracterizar las espinas dendríticas según el tipo de acuerdo a sus características morfológicas (*mushroom*, *thin* y *stubby*), dado que presentan características sinápticas diferentes. Por otra parte, la determinación de la actividad sináptica de espinas individuales es otra observación relevante que acompaña la reorganización estructural de la espina (Matsuzaki et al., 2004). Por lo tanto, estas determinaciones en conjunto permiten inferir no solo cambios en la reorganización estructural de los circuitos neuronales inducidos por los psicoestimulantes, sino también, alteraciones en la fuerza sináptica de los mismos.

La exposición a psicoestimulantes induce adaptaciones neuronales que involucran cambios en la plasticidad estructural, principalmente alteraciones en el NA (Robinson & Kolb, 1997). En este sentido, una de las formas de plasticidad neuronal asociada a la administración repetida de psicoestimulantes son los cambios a largo plazo en la arborización neuronal y la reestructuración de las espinas dendríticas (Robinson & Kolb,

1997). Específicamente, el tratamiento repetido con cocaína o anfetaminas incrementan la densidad de espinas totales y ramificación dendrítica en NA core y shell (Robinson & Kolb, 2004). Apoyando estas observaciones y la relevancia de la plasticidad estructural en la sensibilización conductual, Li y col (Y. Li et al., 2004) reportaron que la inducción de sensibilización conductual a cocaína está acompañada del incremento en la densidad de espinas totales en neuronas del NA core, sin cambios en shell (Y. Li et al., 2004). Sin embargo, otros autores reportaron que luego del tratamiento crónico con cocaína sólo se produce un incremento en la densidad de espinas en el NA shell (Dietz et al., 2012). Asimismo, si bien no hay un consenso al respecto, un gran número de autores reportaron que luego de la administración de psicoestimulantes se produce un incremento en la densidad total de espinas en el NA, lo cual estaría asociado al incremento en la densidad de espinas inmaduras tipo *thin* (Dietz et al., 2012; Dobi et al., 2011; Dumitriu et al., 2012; Y. Kim et al., 2009; Laplant et al., 2010; Lee et al., 2006). Estas observaciones acompañan estudios electrofisiológicos que revelan que en tiempos relativamente cortos respecto de la última administración de psicoestimulantes ocurre una depresión a largo plazo (LTD en inglés "*long term depression*") en la sinapsis, sugiriendo que los psicoestimulantes inducen plasticidad neuronal (Thomas et al., 2000, 2008; Thomas & Malenka, 2003).

La diferenciación de las poblaciones de neuronas medias espinosas GABAérgicas (MSNs en inglés "*medium spines neurons*") que conforman el NA según la expresión de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (D<sub>1</sub>-MSNs y D<sub>2</sub>-MSNs) permitió examinar con más detalle los cambios morfológicos en el NA, así como también establecer diferencias en la plasticidad en los subcompartimientos core y shell. En este sentido, algunos trabajos revelaron una robusta plasticidad estructural solo en neuronas D<sub>1</sub>-MSNs en los subcompartimientos de NA luego del tratamiento crónico con cocaína (Dobi et al., 2011), específicamente un incremento en la densidad de espinas solo en las D<sub>1</sub>-MSNs inducido por la cocaína. Otros autores en cambio, mostraron que el incremento en la densidad de espinas solo ocurre en NA shell luego del tratamiento con la droga (J. Kim et al., 2011). Por el contrario, Lee y col (Lee et al., 2006) revelaron que la administración crónica de cocaína incrementa la densidad de espinas dendríticas en las dos poblaciones de D<sub>1</sub>-MSNs y D<sub>2</sub>-MSNs tanto en NA core como en shell, pero las modificaciones a largo plazo solo persisten en la población de D<sub>1</sub>-MSNs luego de transcurrido 1 mes de la exposición a la droga (Lee et al., 2006). De esta manera, si bien la activación de D<sub>1</sub>-MSNs y D<sub>2</sub>-MSNs

contribuye con los efectos gratificantes de la cocaína (Boyd & Mailman, 2012), los cambios a largo plazo inducidos por la droga parecen estar mediados por modificaciones en la población de D<sub>1</sub>-MSNs (Ambroggi et al., 2009; Bertran-Gonzalez et al., 2008; Kelz et al., 1999; Lee et al., 2006; J. Zhang et al., 2006).

En esta línea, además, el estudio de la plasticidad estructural luego de un periodo de abstinencia sugirió que las modificaciones estructurales en el NA core y shell podrían estar influenciadas por el tiempo transcurrido luego de la última administración de la droga. En este sentido, Dumitriu y col (Dumitriu et al., 2012) reportaron que animales expuestos a la administración de cocaína crónica durante 7 días consecutivos no relevaron cambios en la densidad total de espinas en el NA core, luego de transcurridas 4 h de abstinencia de la droga, pero si revelaron un incremento en la densidad de espinas totales en el NA shell al tiempo medido. Además, luego de 24 h de abstinencia, se observó una disminución en la densidad de espinas presentes en el NA core y un incremento en shell. Sin embargo, luego de 28 días de abstinencia, se observó que la densidad de espinas totales en el NA core permanece disminuida y esta disminución fue atribuida a la presencia de espinas tipo *thin*, mientras que la densidad de espinas en el NA shell retorna a niveles basales (Dumitriu et al., 2012), sugiriendo que los cambios estructurales son diferentes en el core y en el shell, y están influenciados por el tiempo de abstinencia luego de la última administración de la droga. En esta misma línea, Shen y col (H. Shen et al., 2009) reportaron que ratas expuestas durante 7 días a un régimen de cocaína capaz de inducir sensibilización, mostraron un incremento en la densidad de espinas totales en NA al día 21, luego de 2 h de recibir una dosis desafío de cocaína (H. Shen et al., 2009) y este incremento en la densidad de espinas estuvo acompañado por el aumento en el tamaño de la cabeza de las espinas dendríticas en el NA (H. Shen et al., 2009). Además, este trabajo reportó que una dosis aguda de cocaína induce cambios similares en la plasticidad estructural de NA, pero en un periodo de tiempo mayor (H. Shen et al., 2009). Es decir, una dosis aguda de cocaína tiene la capacidad de inducir cambios rápidos en la plasticidad estructural del NA, en animales previamente sensibilizados y expuestos a un periodo de abstinencia, lo cual podría estar asociado a la capacidad que tiene la cocaína para modificar la respuesta conductual luego de un periodo libre de droga (Kalivas & O'Brien, 2008; Koob & Le Moal, 2001; Robinson & Berridge, 1993).

En correlación con estas observaciones, estudios electrofisiológicos reportaron que la fuerza sináptica en las sinapsis glutamatérgicas del NA, puede ser modificada

diferencialmente frente a una dosis de cocaína en animales que previamente fueron expuestos a un régimen de droga, respecto de aquellos animales que nunca tuvieron un contacto previo con la droga (Kourrich et al., 2007). Brevemente, la exposición repetida a psicoestimulantes *in vivo* aumenta el número de espinas dendríticas en NA (Robinson & Kolb, 2004), así como también la expresión de receptores AMPA de superficie (Boudreau & Wolf, 2005), y la respuesta conductual a la infusión de AMPA (Cornish & Kalivas, 2000; Pierce et al., 1996; Suto et al., 2004), lo cual sugiere que los psicoestimulantes pueden potenciar las sinapsis glutamatérgicas en el NA. Sin embargo, algunos estudios reportaron que la cocaína repetida *in vivo* reduce las AMPAR EPSC en el NA shell (Thomas et al., 2001) y esta depresión sináptica parece jugar un papel importante en los cambios conductuales asociados a la sensibilización conductual (Brebner et al., 2005), ya que el bloqueo de la endocitosis de los receptores AMPA en el NA shell interfirió la expresión de la sensibilización conductual a anfetaminas. En este sentido, Kourrich y col (Kourrich et al., 2007) reportaron que la exposición repetida a la cocaína seguida de un período prolongado de abstinencia desencadena una potenciación persistente de las sinapsis excitatorias de NA, acompañada por el incremento en el ratio AMPA/NMDA, asociado al incremento en la función y/o el número de receptores AMPA en la sinapsis, sin cambios en la función sináptica de los receptores NMDA. Sin embargo, durante la abstinencia temprana el ratio AMPA/NMDA disminuye lo que sugiere que la potenciación sináptica no ocurre durante la abstinencia temprana, pero se desarrolla en función de la duración de la abstinencia. La relevancia de estas observaciones, se determinó luego de reexposición de los animales a la cocaína durante la abstinencia prolongada, en donde se observó que una dosis desafío de cocaína reduce el ratio AMPA/NMDA, lo cual sugiere que la droga es un potente estímulo para provocar un cambio en la dirección de la plasticidad sináptica dependiente de la experiencia en animales con un historial de exposición a la cocaína (Kourrich et al., 2007).

### **Plasticidad estructural y sináptica mediada por estrés en el NA**

Similar a los descrito en respuesta a la administración de psicoestimulantes, la exposición a situaciones estresantes puede inducir cambios en la plasticidad estructural en áreas neuronales que conforman el circuito de la motivación, como NA (Fox et al., 2018, 2020; Garcia-Keller et al., 2016; S. A. Golden et al., 2013; Khibnik et al., 2016). El estrés por derrota social modela características conductuales asociadas a patologías como la depresión y la ansiedad, como son el comportamiento de evasión social o los



estados de anhedonia (Berton & Nestler, 2006; Krishnan et al., 2007). Sin embargo, esta descrito que existen diferencias individuales en las respuestas de afrontamiento al estrés (Krishnan et al., 2007) ya que la derrota social solo induce evasión social o anhedonia en un subgrupo de animales considerados susceptibles, respecto de aquellos animales expuestos al estresor pero que no desarrollan conductas tipo depresivas, considerados resilientes. En este sentido, Christoffel y col (Christoffel, Golden, Dumitriu, et al., 2011) reportaron que la exposición a estrés por derrota social incrementa la densidad total de espinas y la densidad de espinas tipo *stubby*, sin cambios en la densidad de espinas tipo *thin* y *mushroom*, en el NA shell de animales susceptibles. Estos cambios además, estuvieron acompañados por una tendencia hacia la disminución en el tamaño de la cabeza de las espinas en los animales susceptibles al estrés (Christoffel, Golden, Dumitriu, et al., 2011). Es decir, que la derrota social induce la formación de nuevas espinas cuyo cambio está asociado al incremento en la densidad total de espinas, a expensas solo del incremento en la densidad de espinas tipo *stubby*. En esta misma línea, los estudios electrofisiológicos demostraron que la formación de nuevas espinas involucra la presencia de densidades postsinápticas (PSD) pequeñas con un aumento en la frecuencia de las corrientes postsinápticas mini-excitadoras (mEPSCs) en NA, lo que indica un mayor número de sinapsis glutamatérgicas funcionales inducidas por estrés en el NA shell (Christoffel, Golden, Dumitriu, et al., 2011). Acompañando estas observaciones, y considerando las dos subpoblaciones de neuronas que conforman el NA, Fox y col (Fox et al., 2018) reportaron la presencia de atrofia dendrítica diferencialmente en las D<sub>1</sub>-MSNs en NA luego de un régimen de estrés por derrota social y esto se correlacionó con la conducta de evasión social (Fox et al., 2018). En esta misma línea, Fox y col (Fox et al., 2020) describieron el incremento en la densidad de espinas en la población D<sub>2</sub>-MSNs luego de un régimen de estrés por derrota social, asociado al incremento de la densidad de espinas tipo *thin* y *stubby*. Sin embargo, el incremento en espinas tipo *thin* se correlacionó negativamente con la conducta de evasión social (Fox et al., 2020).

Estudios electrofisiológicos basados en la investigación de las alteraciones funcionales desencadenadas por las neuroadaptaciones inducidas por la cocaína o por la exposición a estrés por derrota social sugieren cambios diferentes en la función sináptica del NA, principalmente en shell (Khibnik et al., 2016). En este sentido, Khibnik y col (Khibnik et al., 2016) reportaron que la fuerza sináptica en respuesta a estrés o cocaína medida en espinas individuales de las D<sub>1</sub>-MSNs y las D<sub>2</sub>-MSNs es modulada

bidireccionalmente en las espinas *mushroom*, y estas adaptaciones sinápticas son específicas del tipo de célula y no se superponen entre el estrés y la cocaína. Específicamente, la cocaína induce una regulación a la baja en la amplitud de las corrientes de excitación unitarias postsinápticas (uEPSC) en espinas tipo *mushroom* de las D<sub>1</sub>-MSNs, y estos hallazgos son consistentes con las observaciones previas que describen una disminución del radio AMPA/NMDA y en las mEPSC en D<sub>1</sub>-MSNs en respuesta a cocaína luego de un periodo de abstinencia temprana (Kourrich et al., 2007; MacAskill et al., 2014; Pascoli et al., 2014; Thomas et al., 2001). Sin embargo, otro trabajo reportó un incremento en las mEPSC específico en la población de D<sub>1</sub>-MSNs luego de la cocaína (MacAskill et al., 2014). Además, Khibnik y col (Khibnik et al., 2016) reportaron que no se producen cambios en la mEPSC en respuesta a cocaína en la población D<sub>2</sub>-MSNs, sino una redistribución de la fuerza sináptica. Estas observaciones difieren en respuesta a estrés crónico, en donde ratones resilientes exhibieron un incremento en las uESPC en las espinas *mushroom* en la población de D<sub>1</sub>-MSNs, mientras en la población de D<sub>2</sub>-MSNs exhibieron una significativa regulación a la baja en este subtipo de espinas. Estos estudios concuerdan con otros antecedentes que muestran que la activación de las D<sub>1</sub>-MSNs induce resiliencia, mientras que la activación de la población de D<sub>2</sub>-MSNs promueve susceptibilidad al estrés (Francis et al., 2015). Además, en ratones susceptibles se observó un incremento en las mESPC que reflejan un aumento en el número total de espinas en las D<sub>2</sub>-MSNs en lugar de un cambio en la fuerza sináptica (Christoffel, Golden, Dumitriu, et al., 2011; S. A. Golden et al., 2013). Por último, el incremento en espinas tipo *thin* asociado a la exposición a estrés o cocaína podrían contribuir en las adaptaciones en la fuerza sináptica, ya que estas espinas son sensibles a glutamato, por lo que, es posible que espinas recién formadas contribuyan activamente con las alteraciones en la trasmisión sináptica que podrían servir para desencadenar adaptaciones en la fuerza sináptica de NA (Khibnik et al., 2016).

En síntesis, tanto la cocaína como la exposición a estrés inducen neuroadaptaciones en el NA, que involucran cambios en la plasticidad estructural y en la fuerza sináptica de las MSNs. Específicamente, el estrés y la cocaína a largo plazo, incrementan la densidad de espinas, el radio AMPA/NMDA y la fuerza sináptica en el NA, similar a las adaptaciones inducidas por cocaína o estrés en las neuronas dopaminérgicas del ATV (Saal et al., 2003). Además, conductualmente, ambos inducen sensibilización frente a una posterior inyección de cocaína y a la inversa, la

administración crónica de cocaína aumenta la susceptibilidad al estrés por derrota social (Covington et al., 2010; Covington & Miczek, 2005), por lo cual, el estudio de la plasticidad en el NA y los mecanismos moleculares que controlan la plasticidad conductual y sináptica son un punto clave en los trastornos por adicción y estrés. Estudios de nuestro laboratorio demostraron que la exposición a estrés agudo por inmovilización, induce sensibilización frente a una dosis desafío de cocaína, 21 días después de la exposición al estresor, así como también facilita la adquisición de la conducta de AA de cocaína (Garcia-Keller et al., 2013, 2016). Además, la expresión de la sensibilización a cocaína inducida por estrés estuvo acompañada por el incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie subunidad GluR1 en el NA core. En tanto, estudios electrofisiológicos y estructurales revelaron un incremento en la densidad de espinas dendríticas en el NA core y en el radio AMPA/NMDA inducido 21 días después de la exposición a estrés agudo por inmovilización (Garcia-Keller et al., 2016). En línea con estos hallazgos, Esparza y col (Esparza et al., 2012) reportaron que 21 días después de la última exposición a estrés crónico por inmovilización (estrés crónico de 7 días consecutivos por inmovilización), la expresión de la sensibilización conductual a cocaína está acompañada del remodelado del citoesqueleto de actina en NA core, e involucra el incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie subunidad GluR1, así como también, el incremento en la PSD de las espinas de NA core. Por lo cual, la evidencia de nuestro laboratorio sugiere que la expresión a largo plazo de la sensibilización conductual inducida por la exposición a estrés por inmovilización recapitula algunas de las neuroadaptaciones estructurales y funcionales, que se cree que sustentan la sensibilización conductual inducida por la administración diaria de cocaína, sugiriendo que las adaptaciones neurobiológicas a largo plazo en la sinapsis glutamatérgica en el NA son la base de la sensibilización cruzada a la cocaína inducida por estrés e involucran el remodelado del citoesqueleto de actina en las espinas dendríticas.

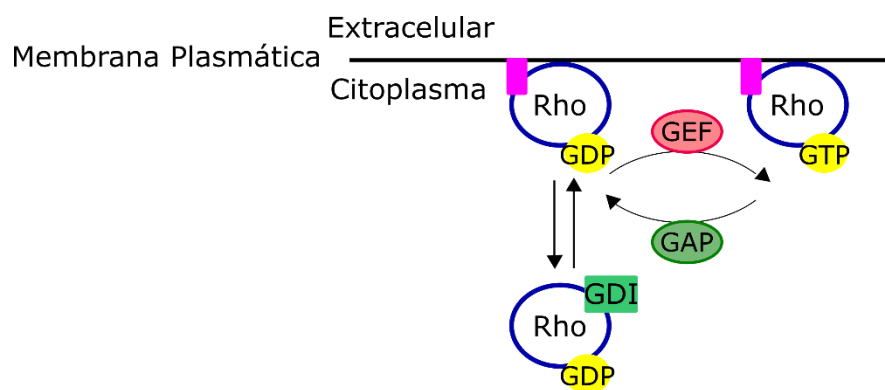
## REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA: PARTICIPACIÓN DE LAS RHOGTPASAS EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA

### RhoGTPasas

La familia de RhoGTPasas son proteínas de bajo peso molecular (~ 21 Kd) con capacidad de unión a nucleótidos guanina. Múltiples estudios demostraron que son importantes reguladores moleculares que participan tanto en la expresión de receptores de superficie en las espinas dendríticas con el remodelado del citoesqueleto de actina y los microtúbulos. Si bien esta familia de proteínas está dividida en siete subfamilias, las principalmente estudiadas son Rho, Rac1 y Cdc42. Específicamente, las RhoGTPasas son mediadores críticos del crecimiento neuronal, la formación de espinas dendríticas y polaridad neuronal e importantes reguladores de la dinámica del citoesqueleto de actina (Bradke & Dotti, 1999; Stankiewicz & Linseman, 2014). En este sentido, algunos estudios sugirieron que Rac, Cdc42 y Rho exhiben una relación antagónica respecto de la morfología neuronal. Por ejemplo, Kozma y col (Kozma et al., 1997) revelaron que la inyección de Rac1 o Cdc42 en células de neuroblastoma favorece el desarrollo del cono de crecimiento y el crecimiento de neuritas, mientras que la inyección de RhoA inhibió el desarrollo del cono de crecimiento inducido por la inyección de Cdc42, llevando al colapso del cono y la retracción de neuritas (Kozma et al., 1997), sugiriendo un rol antagónico de RhoA respecto de Rac1/Cdc42 en la morfología neuronal. Además, en la regulación de la formación dendrítica la estimulación de receptores de NMDA incrementa la actividad de Rac y Cdc42, mientras que la actividad de RhoA se reduce, promoviendo el crecimiento y la ramificación dendrítica, por lo cual, son consideradas como reguladores esenciales de la morfología neuronal (Newey et al., 2005). Sin embargo, las RhoGTPasas también participan en otras funciones celulares esenciales, como por ejemplo la transcripción general (Hill et al., 1995), progresión del ciclo celular (Olson et al., 1995), supervivencia celular y muerte (Heasman & Ridley, 2008; Linseman & Loucks, 2008).

La activación de las RhoGTPasas está caracterizada por su capacidad de ciclar entre dos conformaciones que permiten regular rápidamente su actividad, un estado activo unido a guanosín trifosfato (GTP) y un estado inactivo unido a guanosín difosfato (GDP). Su activación es facilitada por factores intercambiadores de nucleótidos guanina (GEFs en inglés “*guanosine exchange factors*”), los cuales promueven el intercambio de GDP por GTP, y así la activación de la proteína. La inactivación es inducida por la acción de

proteínas con actividad GTPasas (GAPs en inglés “*GTPase activating protein*”), las cuales estimulan el recambio GTP por GDP. Además, la participación de inhibidores de la disociación de guanina (GDIs en inglés “*guanine dissociation inhibitors*”) permiten la correcta localización de la RhoGTPasa en la membrana celular y posterior activación (**Figura 4**) (Stankiewicz & Linseman, 2014). De esta manera, la regulación de las RhoGTPasas asociado a la activación de GEFs y GAPs, permitió su estudio en múltiples procesos celulares utilizando herramientas de biología molecular, como por ejemplo, la expresión de mutaciones para alterar su activación mediante su capacidad de unión a GTP y/o GDP o ensayos de actividad que permitieron medir el estado de activación promedio de una GTPasa en una población neuronal determinado. Sin embargo, estudios avanzados que contemplan la activación espacio temporales sugirieren la presencia de complejas redes de señalización intracelular encargadas de controlar la activación precisa de las RhoGTPasas, tanto en células neuronales como en otro tipo de células, que implican la activación de las RhoGTPasas en el mismo momento pero en distintas localizaciones celulares (Pertz, 2010).



**Figura 5. Activación de la familia de RhoGTPasas.** Imagen adaptada de Stankiewicz y Linseman (Stankiewicz & Linseman, 2014). El factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) cataliza la conversión del GDP en GTP para promover la activación de RhoGTPasa. Las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) inactivan la Rho GTPasa estimulando la capacidad de Rho GTPasa para hidrolizar GTP a GDP. Finalmente, los inhibidores de la disociación de guanina (GDI) regulan la activación de Rho GTPasa secuestrando la Rho GTPasas en un estado unido a GDP en el citosol.

Muchas vías de señalización moleculares controlan los cambios en la morfología de las espinas dendríticas a través de la regulación de la actina filamentosa (F-actina), algunas a través de la interacción directa con actina, y otras a través de efectoras aguas

abajo (Pontrello & Ethell, 2009). La función de las RhoGTPasas en la regulación de la dinámica y la morfogénesis de las espinas dendríticas se estudió principalmente utilizando herramientas clásicas de biología molecular que incluyeron la expresión de mutantes para interferir el estado de activación de las RhoGTPasas y evaluar así su participación. En este sentido, la expresión de la mutante Rac1 constitutivamente activa, la cual induce un cambio conformacional en la proteína favoreciendo su activación permanente a través de su unión a GTP, se observó que favorece el desarrollo de espinas múltiples de tamaño mucho más pequeño de lo normal en células de Purkinje del cerebelo (Harris et al., 1992). De manera similar, en cultivos de células piramidales, se observó que la expresión de Rac1 constitutivamente activa interrumpió la morfología normal de las espinas dendríticas, provocando un aumento de protuberancias dendríticas (procesos similares a filopodios) (Nakayama et al., 2000; S.-H. Shi et al., 2001). Mientras que la expresión de la mutante Rac1 dominante negativa, la cual induce una mutación en la proteína que favorece su unión a GDP y por lo tanto, su inactivación permanente, provocó una reducción progresiva en el número de espinas (Nakayama et al., 2000), lo que indica que Rac1 es importante en el mantenimiento de la densidad de espinas dendríticas. Apoyando estas observaciones, alteraciones en algunos GEFs contribuyen en el mantenimiento de la morfología de las espinas dendríticas. La sobreexpresión de Kalirina-7, uno de los GEFs activadores de la proteína Rac1, en neuronas corticales incrementa el número y el tamaño de las espinas dendríticas. Mientras que la ausencia de actividad de Kalirina-7 reduce el número de espinas presentes en estas neuronas (Penzes et al., 2001).

De manera similar, se describió que la sobreexpresión de la mutante de Rho constitutiva activa modifica la densidad y la morfología de las espinas dendríticas. En particular, se observó que su sobreexpresión disminuye la densidad de espinas en las dendritas basales y apicales, y en algunos casos llevando a la ausencia casi total y las pocas espinas presentes presentaron anomalías en el tamaño del cuello (Tashiro et al., 2000), lo cual sugirió que la expresión de Rho reprime el mantenimiento y la elongación de espinas (Tashiro et al., 2000). Mientras que la inhibición de la actividad de Rho resultó en un incremento en el número de espinas y en la formación de espinas con cuellos alargados, lo que permitió inferir que la actividad de Rho tiene un rol importante en la regulación de la morfología de las espinas, particularmente en formación, retracción y estabilización de las espinas dendríticas. De esta manera, estos hallazgos sugirieron que

la señalización de Rac1 y Rho participan en la morfogénesis de las espinas dendríticas pero su regulación es antagónica durante a la formación de nuevas espinas (Tashiro et al., 2000). Por otra parte, Tashiro y col (Tashiro et al., 2000) evaluaron la participación de Cdc42 en la densidad y tamaño de las espinas dendríticas en cultivos de neuronas de hipocampo y reportaron que la expresión de una mutante de Cdc42 constitutiva activa en neuronas piramidales del hipocampo no altera la morfología de las dendritas apicales y basales en un porcentaje de las células transfectadas, así como tampoco altera la morfología de las espinas dendríticas presentes, mientras que, en otro porcentaje de células, se observaron espinas dendríticas anormalmente cortas, con puntas prominentes y espinas *stubby* anormales. Además, la expresión de una mutante constitutiva negativa de Cdc42 (la cual promueve la inactivación de la RhoGTPasa a través de la unión a GDP) en estas neuronas no alteró la morfología y el largo de las espinas dendríticas presentes (Tashiro et al., 2000).

El control de la dinámica de actina dentro de las espinas dendríticas mediado por las RhoGTPasas Rac1, RhoA y Cdc42 involucra numerosas efectoras aguas abajo que de manera conjunta regulan la dinámica del citoesqueleto de actina en las espinas dendríticas en respuesta a diferentes estímulos. En este sentido, la activación de Rac1 estimula la polimerización de actina filamentosa (F-actina) y estabiliza las espinas dendríticas a través de la activación de la proteína p21-quinasa-activada (PAK), su efector cascada abajo LIM quinasa 1 (LIMK1) y la proteína de unión a actina cofilina (Govek et al., 2004; Meng et al., 2002; H. Zhang et al., 2005). Mientras que la activación de RhoA y Rho quinasa (ROCK), conduce a la activación de LIMK1, la cual inactiva a la proteína cofilina a través de fosforilación impidiendo la acción depolimerizante de cofilina, favoreciendo la reducción en el recambio y una mayor estabilidad de los filamentos de actina (Bernard, 2007; Maekawa et al., 1999). Además Cdc42 a través de la activación de PAK y LIMK1 inhibe la depolimerización de actina (Edwards et al., 1999).

### **ADF y cofilina**

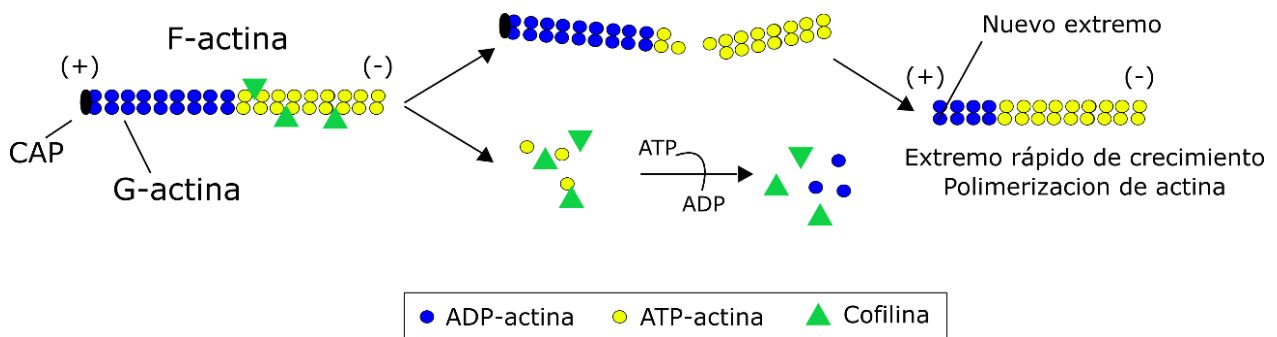
En mamíferos, la familia de ADF/cofilina comprende tres tipos de proteínas denominadas: cofilina1 (cofilina no muscular, n-cofilina), cofilina2 (cofilina muscular, m-cofilina) y ADF (factor depolimerizante de actina, destrina). Tanto cofilina y ADF se encuentran expresadas en el cerebro adulto (Bellenchi et al., 2007; Görlich et al., 2011) y ambas se encuentran presentes en las sinapsis excitatorias (Görlich et al., 2011; Racz & Weinberg, 2006) principalmente en las espinas dendríticas. Numerosos estudios

establecieron que la presencia de ADF/cofilina a nivel neuronal es crítica para la morfología de las espinas dendríticas (Bosch et al., 2014; Gu et al., 2010; Hotulainen et al., 2009; Rust et al., 2010), y controlan tanto aspectos funcionales como estructurales asociados a la plasticidad sináptica (Bosch et al., 2014; Gu et al., 2010; Rust et al., 2010; Q. Zhou et al., 2004). Ambas proteínas tienen funciones redundantes y superpuestas en la liberación de neurotransmisores en la sinapsis (Rust, 2015; M. Wolf et al., 2015; Zimmermann et al., 2014). En este sentido, Wolf y col (M. Wolf et al., 2015) reportaron que la expresión de dobles mutaciones de ADF y cofilina en ratones induce un deterioro severo de la fisiología neuronal presináptica del hipocampo, comparado con las alteraciones observadas en ratones que expresan mutaciones de ADF y cofilina individuales. En particular, las alteraciones en la dinámica de la actina causadas por las dobles mutaciones provocaron defectos en la organización, movilización y exocitosis de las vesículas sinápticas y alteraciones en la liberación de glutamato, sugiriendo funciones superpuestas para ADF y cofilina en fisiología presináptica. Sin embargo, se reportó que cofilina es el factor limitante en la plasticidad postsináptica, mientras que la presencia de, ya sea, ADF o cofilina es suficiente para impulsar la remodelación de actina durante la fisiología presináptica (M. Wolf et al., 2015). Además, se describió que la inactivación genética de *cofilin1* y ADF perjudica el aprendizaje, y causa anomalías graves en el comportamiento (Goodson et al., 2012; Rust et al., 2010; Zimmermann et al., 2014). De esta manera, los estudios sugieren que ADF/cofilina es un factor clave para la correcta fisiología de las espinas dendríticas y alteraciones en su expresión pueden provocar a alteraciones en la plasticidad sináptica que impactan en el comportamiento.

Cofilina es un regulador directo de la dinámica de actina, de manera compleja y dependiente de la concentración (Hild et al., 2014). A bajas concentraciones cofilina promueve el desensamblado de los filamentos de actina (F-actina), acelerando la disociación de los monómeros de actina (G-actina) en los extremos negativos de los filamentos y cortando filamentos de actina (Blanchoin & Pollard, 1999; Maciver et al., 1991). En este sentido, el corte de los filamentos de actina puede resultar en un ensamblaje de red o en un desensamblado, dependiendo de la concentración local de G-actina y la actividad de proteínas polimerizantes de actina (Van Troys et al., 2008). Por el contrario, a altas concentraciones, cofilina puede promover el ensamblaje de F-actina nucleando nuevos y estabilizados filamentos preexistentes (Andrianantoandro & Pollard, 2006) (**Figura 6**).



La unión de cofilina a la actina está controlada por fosforilación (inactivación) y desfosforilación (activación) de un conservado residuo de serina en la posición 3 (Ser3) (Bernstein & Bamburg, 2010) de la proteína. El control de este evento está a cargo de potentes reguladores aguas arriba de cofilina denominados LIM quinasa 1 (LIMK1) y *Slingshot* fosfatasa (SSH) (Niwa et al., 2002; N. Yang et al., 1998).



**Figura 6. Actividad de cofilina. Imagen adaptada de Pontrello y Ethell (Pontrello & Ethell, 2009).**

El corte de los filamentos de actina por parte de cofilina promueve la formación de nuevos filamentos y el remodelado de las espinas dendríticas (Pontrello & Ethell, 2009).

### **Papel funcional de cofilina en la plasticidad estructural**

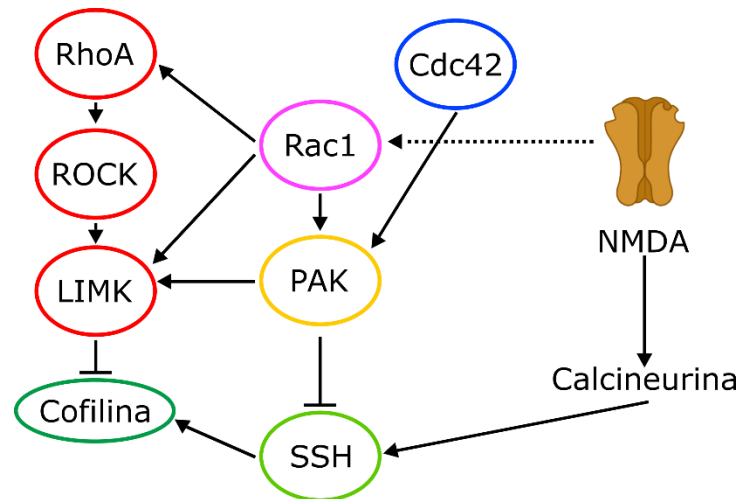
El papel funcional de cofilina en la morfología de las espinas dendríticas, así como también la plasticidad estructural se describió, en primer lugar, sobre la base de estudios realizados con péptidos sintéticos que imitaban la activación e inactivación de cofilina. En este sentido, estos estudios fueron los primeros en implicar a cofilina en la contracción de las espinas dendríticas durante el LTD, y a la inactivación de cofilina durante el crecimiento de la espina durante la inducción del LTP (Bosch et al., 2014; Fukazawa et al., 2003; Morishita et al., 2005; Q. Zhou et al., 2004). Además, otros estudios, demostraron que el incremento en la actividad de cofilina dado por la manipulación genética de manera negativa de LIMK, uno de sus principales reguladores, resulta en un perfil anómalo de espinas tipo *thin* (Meng et al., 2002). Mientras que el crecimiento de las espinas tras la inducción del LTP o tras el aprendizaje fue asociado con niveles sinápticos elevados de fosforilación de cofilina (L. Y. Chen et al., 2007; Fedulov et al., 2007). Otros estudios abordaron el papel funcional de cofilina de manera más directa en la plasticidad sináptica utilizando mutaciones de la proteína para alterar su estado de activación, y revelaron que la sobreexpresión de la mutante cofilina constitutivamente inactiva (en su estado fosforilado) en cultivos de hipocampo promueve la presencia de

espinas más maduras e incrementa la densidad de espinas (Gu et al., 2010; Shankar et al., 2007), mientras que la sobreexpresión de la mutante cofilina constitutivamente activa (en su estado no fosforilado) induce un perfil de espinas inmaduras, similar a lo observado bajo la estimulación de baja frecuencia provocada por el receptor NMDA durante el LTD (Pontrello et al., 2012; Y. Shi et al., 2009). En esta misma línea, la expresión de un RNA de interferencia de cofilina en neuronas de hipocampo produce protuberancias dendríticas más largas y un número de espinas tipo *thin* reducido (Hotulainen et al., 2009). Mientras que, en cultivos primarios de hipocampo derivados de ratones transgénicos que expresan una delección del gen que codifica la expresión de cofilina dependiente de Cre recombinasa, se observó que la inactivación del gen de cofilina induce un incremento en el largo de las espinas y el ancho de las cabezas de las espinas (Rust et al., 2010). Acompañando estas observaciones, el estudio de los cortes de tejido de los ratones transgénicos reveló que el crecimiento de las espinas inducido por la delección del gen de cofilina estaba acompañado por el incremento en la densidad de espinas en hipocampo en estos animales, proporcionando evidencia del papel de cofilina1 *in vivo* en la morfología de las espinas dendríticas (Rust et al., 2010). Notablemente, estos dos estudios además, reportaron una dinámica de actina alterada en las espinas dendríticas, dado por el incremento en el radio F/G-actina en sinaptosomas (aislado de terminales nerviosas generados a partir de tejido cerebral fresco), sugiriendo que cofilina controla la morfología de las espinas dendríticas a través de un mecanismo dependiente de actina (Hotulainen et al., 2009; Rust et al., 2010). En conclusión, la inactivación de cofilina es necesaria para el agrandamiento y la estabilización de las espinas durante la inducción de LTP, mientras que la activación impulsa el desensamblado de F-actina y la retracción de espinas durante el LTD.

En esta misma línea, se demostró que cofilina en su estado activo (desfosforilada) se mueve rápidamente en las espinas dendríticas durante la fase inicial del LTP, resultando en un enriquecimiento sináptico y persistente necesario para el agrandamiento de la espina (Bosch et al., 2014). Por lo cual, tiene un papel crucial en la plasticidad estructural de las espinas dendríticas, ya que por un lado promueve el ensamblaje de F-actina durante el LTP, y por otro, es necesario para el desensamblado de F-actina y la contracción de espinas durante el LTD, dos procesos dependientes de la concentración local de actina y cofilina (Andrianantoandro & Pollard, 2006; Hild et al., 2014).

### **Mecanismos moleculares asociados a la regulación de la actividad de cofilina durante la potenciación a largo plazo**

Numerosas cascadas de señalización intracelular se describieron como reguladores de la actividad de cofilina durante la inducción del LTP (**Figura 7**). La estimulación de receptores NMDA incrementa los niveles de F-actina en la sinapsis favoreciendo la estabilización y el crecimiento de las espinas y finalmente permitiendo el LTP, lo cual produce un incremento de cofilina en su estado inactivo fosforilado (p-cofilina) en la sinapsis (L. Y. Chen et al., 2007; Fukazawa et al., 2003). Esta inactivación de cofilina esta mediada por la proteína p21-quinasa activada (PAK) y su efector descendiente LIM quinasa 1 (LIMK1), el cual actúa directamente sobre cofilina, fosforilando el residuo serina en la posición 3 (Ser3) de la proteína. Por su parte, PAK es un efector de las RhoGTPasas Rac1 y Cdc42 (Rane & Minden, 2014), ambos implicados en la regulación de la morfología de las espinas dendríticas y plasticidad sináptica (Irie & Yamaguchi, 2002; Tolias et al., 2005). Además, otras dos RhoGTPasas están involucradas en la regulación de la actividad de cofilina, RhoA y RhoB, las cuales median la inactivación de cofilina en las espinas dendríticas (McNair et al., 2010; Y. Shi et al., 2009). En este sentido, la estabilización de las espinas maduras, depende de la señalización mediada por el receptor EphB2 y la quinasa de adhesión focal (FAK), los cuales median la inactivación de cofilina a través de una vía de señalización que involucra a RhoA, Rho quinasa (ROCK) y LIMK1 (Y. Shi et al., 2009). Consistentemente, la inactivación de ROCK2 resulta en un incremento en la actividad de cofilina y una reducción de F-actina en la sinapsis, con un perfil de espinas inmaduras y LTP deficientes (Z. Zhou et al., 2009). Por otro lado, la activación de RhoB regula la inactivación de cofilina a través de LIMK específicamente en fases tempranas de LTP, pero no durante la fase tardía (McNair et al., 2010). Adicionalmente, otro mecanismo descrito en la regulación de la actividad de cofilina involucra a la integrina  $\beta$  y a la metaloproteínasa-9 de la matriz extracelular (MMP-9), la cual se activa durante la ampliación del LTP y conduce a la inactivación de cofilina (Nagy et al., 2006; X. Bin Wang et al., 2008).



**Figura 7.** Imagen adaptada de Pontrello y Ethell (Pontrello & Ethell, 2009). Principales proteínas reguladores que incrementan o inhiben la actividad de cofilina estudiadas en modelos de adicción a drogas.

### **Papel funcional de cofilina en la acumulación de receptores AMPA**

Numerosos estudios sugieren que cofilina controla la movilidad de receptores AMPA en la sinapsis a través de un mecanismo dependiente de actina, así como también, controla la fuerza sináptica a través de la regulación de la movilidad de los receptores AMPA, de manera independiente a su función en la plasticidad estructural (Rust et al., 2010). En este sentido, la inducción química de LTP conduce a la acumulación sináptica de receptores AMPA que contienen la subunidad GluR1 a través de un mecanismo dependiente de cofilina, que precede al agrandamiento de la espina e involucra la inactivación de cofilina (Gu et al., 2010). Asimismo, la reducción persistente del LTP observado en cultivos neuronales que expresan el péptido de cofilina dominante negativo (S3E, la serina 3 está mutada por un ácido glutámico) sugiere un papel funcional y temporal de cofilina en la acumulación de receptores AMPA en la plasticidad sináptica (Gu et al., 2010), y esto es apoyado por otras observaciones en donde la manipulación de la actividad de cofilina a través péptidos que incrementan o reducen la actividad de cofilina (peptidos S3 o fosfo-S3) en la corteza infralímbica de ratas altera la acumulación de receptores GluR1 y GluR2, independientemente de los cambios en la morfología de las espinas dendríticas (Y. Wang et al., 2013). De esta manera, considerando el rol funcional de cofilina durante la plasticidad, estos hallazgos sugieren una secuencia temporal de activación e inactivación de cofilina durante el LTP, relevante para el agrandamiento inicial de la espina y la acumulación sináptica de receptores AMPA, ambos dependientes de la activación de cofilina, seguido de la consolidación de los

cambios estructurales, dependientes de la inactivación de cofilina en la sinapsis. Por lo cual, cofilina podría actuar como un interruptor molecular durante la plasticidad sináptica, permitiendo el desacoplamiento entre la fuerza sináptica y los cambios morfológicos.

### **MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA PLASTICIDAD ESTRUCTURAL INDUCIDA POR ESTRÉS O PSICOESTIMULANTES**

Las espinas dendríticas son el sitio donde ocurren la mayoría de las sinapsis excitatorias del cerebro, y las adaptaciones moleculares que ocurren dentro de las espinas median la neuroplasticidad inducida por diferentes estímulos en la transmisión excitatoria. La formación de nuevas espinas y el remodelado de las espinas preexistentes dependen de la dinámica de actina (ensamblado y desensamblado de actina). La regulación de la dinámica de actina es mediada en parte por las RhoGTPasas, particularmente Rac1 está involucrada en la remodelación dendrítica y la activación de Rac1 regula la reorganización del citoesqueleto de actina, en parte, a través de la modulación de la actividad de cofilina (Govek et al., 2004; Meng et al., 2002; H. Zhang et al., 2005).

La administración crónica de cocaína, regula el recambio de actina en el NA e incrementa la densidad de espinas y la arborización dendrítica. En este aspecto, uno de los mecanismos propuestos en la regulación la plasticidad estructural mediada por la administración de cocaína es la participación la RhoGTPasa Rac1 y su regulación sobre cofilina (Dietz et al., 2012). En particular, Dietz y col (Dietz et al., 2012) revelaron que la administración crónica de cocaína, pero no aguda, incrementa la actividad de la proteína cofilina en el NA shell, a través de la regulación negativa la actividad de Rac1, y este mecanismo molecular mediado por el incremento en la actividad de cofilina, es responsable de la expansión de las espinas dendríticas en el NA y el aumento en las propiedades de reforzantes de la droga. Además, esta disminución en la actividad de Rac1 inducida por la administración crónica de cocaína, se vio acompañada por la disminución en los niveles de expresión de la proteína de invasión y metástasis 1 de linfoma T (Tiam1), uno de los GEFs aguas arriba de Rac1, el cual permite el recambio GDP-GTP y la activación de Rac1 (Dietz et al., 2012). En esta misma línea, Li y col (J. Li et al., 2015) reportaron que la administración crónica de cocaína regula diferencialmente la actividad de Rac1 y provoca una disminución en el NA y un incremento en el Caudado Putamen

(Cpu), un área neuronal asociada a la formación de hábitos. Este trabajo reveló que la cocaína incrementa la actividad de Rac1 en CPu y a través de este mecanismo promueve el remodelado dendrítico, así como también, regula los cambios a largo plazo en la plasticidad estructural del CPu en respuesta a cocaína. Además, la microinyección en el Cpu de un lentivirus capaz de inducir una mutación en la posición T17N de la proteína Rac1 que impide su activación, previno el condicionamiento del CPP, sugiriendo que el incremento en la actividad de Rac1 mediado por cocaína es necesario para el aprendizaje asociado a la recompensa de la droga (J. Li et al., 2015). Por lo tanto, las diferencias en la activación de Rac1 inducida por cocaína en Cpu y NA sugirieron que su actividad es sitio-específica y probablemente esto se deba a la complejidad de las vías aferentes y eferentes que regulan ambas áreas.

Los GEFs son importantes mediadores en la regulación de la actividad de las RhoGTPasas, ya que permiten la activación de la misma, entre los GEFs de Rac1 se encuentran Kalirina 7 y Tiam1. Kiraly y col (Kiraly et al., 2010) revelaron que ratones knockout para una isoforma de Kalirina 7 expresada en el NA mostraron una mayor sensibilización locomotora por la cocaína respecto de animales que no expresan la mutación. Sin embargo, los ratones knockout revelaron un menor condicionamiento del CPP por la droga, pero un desempeño normal en el condicionamiento del CPP por comida, y no revelaron cambios en la densidad de espinas dendríticas en NA core, comparado con sus controles quienes revelaron un incremento en la densidad de espinas luego de 8 días de tratamiento con cocaína (Kiraly et al., 2010), sugiriendo la posibilidad de que las vías estriatales que participan en este aprendizaje de asociación entre la recompensa de la droga o el alimento y el contexto son diferentes así como también la participación de Kalirina 7. Por otra parte, Chandra y col (Chandra et al., 2013) reportaron una disminución en los niveles de expresión de Tiam1 en el NA de animales expuestos durante de 10 días consecutivos a un esquema de AA de cocaína, así como también, en ratas sensibilizadas con la droga. Además, mediante estudios de optogenética se evaluó el papel de las dos poblaciones de MSNs que conforman el NA (en función del contenido de receptores Dopaminérgicos), y los resultados revelaron que la estimulación neuronal de D<sub>1</sub>-MSNs durante 5 días consecutivos resultó en una disminución en los niveles de ARNm de Tiam1, similar a los efectos desencadenados por la cocaína. Mientras que, la activación de D<sub>2</sub>-MSNs no alteró los niveles de Tiam1. Además, la activación optogenética de D<sub>2</sub>-MSNs durante los días 4 y 5 luego de la inducción de la

sensibilización a cocaína, así como, la inhibición de la actividad de D<sub>1</sub>-MSNs durante los días 2 a 4, previno la sensibilización conductual a cocaína, es decir, que la estimulación repetida de la población de D<sub>1</sub>-MSNs disminuye la expresión de Tiam1, similar al efecto descrito luego de la cocaína, y su inhibición media las respuestas conductuales a cocaína a corto plazo, resaltando la implicancia de la activación de las D<sub>1</sub>-MSNs en la regulación de la dinámica de actina en las espinas dendríticas en respuesta a la cocaína (Chandra et al., 2013).

Por su parte, también se reportó la participación de Rac1 en respuesta a psicoestimulantes luego de la administración de metanfetaminas (METH). Particularmente, se describió que la disminución de la actividad de Rac1 media la adquisición de la memoria contextual asociada a METH y el aumento inducido por METH en la densidad de espinas *thin* en el NA, mientras que el aumento de la señalización de Rac1 es importante para la extinción de la memoria contextual asociada a METH y eliminación de espinas *thin*. Además, METH induce el aumento de espinas dendríticas en las dos poblaciones de D<sub>1</sub>-MSNs y D<sub>2</sub>-MSNs durante el proceso de adquisición, pero el entrenamiento de extinción disminuye selectivamente la densidad de espinas en las D<sub>1</sub>-MSNs y Rac1 es responsable de la plasticidad inducida por METH en las D<sub>1</sub>-MSNs, pero no en la población D<sub>2</sub>-MSNs. Es decir que Rac1 tendría roles opuestos en la adquisición y extinción de la memoria contextual asociada a METH, pero un rol específico en la plasticidad estructural inducida por METH en el NA (Zhao et al., 2019). Además, Tu y col (Tu et al., 2019) reportaron que la activación de D<sub>1</sub>-MSNs y D<sub>2</sub>-MSNs median el condicionamiento del CPP a METH, pero Rac1 es activada de manera diferencial por estas poblaciones neuronales en respuesta a METH. La activación de D<sub>1</sub>-MSNs promueve la activación de Rac1 y Cdc42, mientras que la activación de D<sub>2</sub>-MSNs inhibe la activación de Rac1 e incrementa la activación de Cdc42 necesaria para la asociación entre el refuerzo inducido por la administración de METH y el contexto y los cambios la plasticidad estructural en el NA, pero no la actividad locomotora luego de la droga (Tu et al., 2019).

Al igual que los psicoestimulantes, la exposición a estresores, inducen el remodelado dendrítico en el NA a través de la regulación de mediadores moleculares que modulan la dinámica de actina y, por ende, las alteraciones en la plasticidad estructural. Las vías de señalización que involucran la participación de cofilina y sus reguladores aguas arriba son un punto clave de la investigación en modelos animales de depresión y

trastornos por estrés (Fan et al., 2018; Fox et al., 2018, 2020; Gao et al., 2020; Garcia-Keller, Neuhofer, et al., 2019; Garcia Rojo et al., 2017; S. A. Golden et al., 2013; Y. Lu et al., 2019; Qiao et al., 2016). Golden y col (S. A. Golden et al., 2013) reportaron que la regulación epigenética de Rac1 en el NA es un mecanismo involucrado en la depresión y tiene un papel funcional en los comportamientos asociados a trastornos por estrés. Específicamente, la exposición a estrés por derrota social provocó una disminución a largo plazo en la regulación transcripcional de Rac1 en el NA de ratones susceptibles, pero no en aquellos no susceptibles. Y este evento molecular se correlacionó con la conducta de evasión social en ratones susceptibles al estrés. Además, acompañando estas observaciones se describió que un incremento en la densidad de espinas inmaduras tipo *stubby* en el NA de animales susceptibles, y se observó un incremento en la localización de cofilina en este tipo de espinas 48 h después del estresor, sugiriendo que cofilina participa en la redistribución de la fuerza sináptica inducida por estrés en el NA. Considerando la participación de la vía de señalización de Rac1 y cofilina en la morfología y mantenimiento de las espinas dendríticas y la activación sitio-específica propuesta para cofilina durante la inducción del LTP y LTD (Rust, 2015) esta vía de señalización, por lo tanto, podría regular la delicada interfaz entre los estímulos extracelulares y la reorganización del citoesqueleto de actina para adecuar la transducción neuronal. Por lo cual, la disminución en la actividad de Rac1 inducidos por estrés en el NA, podrían jugar un papel importante en el establecimiento del umbral necesario para la plasticidad dependiente de la experiencia dentro del NA (S. A. Golden et al., 2013).

Cabe mencionar además, que la vía de señalización que involucra a la RhoGTPasa RhoA/Rho quinasa (ROCK) fue implicada en el remodelado dendrítico de la población de D<sub>1</sub>-MSNs en NA inducido por estrés por derrota social en animales susceptibles (Fox et al., 2018). En particular, Fox y col (Fox et al., 2018) mostraron que la exposición a estrés por derrota social causa atrofia dendrítica e incrementa la actividad de RhoA de manera selectiva en la población D<sub>1</sub>-MSNs, lo cual parece ser suficiente para impulsar conductas de evasión social y anhedonia (Fox et al., 2018). Además, esta vía de señalización de RhoA/ROCK se encuentra implicada en la regulación de la actividad de cofilina en las espinas dendríticas, y su activación en hipocampo media la pérdida de espinas dendríticas en ratas expuestas a estrés crónico por restricción (Garcia Rojo et al., 2017).



Por otra parte, las RhoGTPasas también están implicadas en las alteraciones estructurales inducidas por estrés en otras áreas neuronales y en respuesta a diferentes estresores. En este sentido, Fan y col (Fan et al., 2018) informaron que la expresión a estrés crónico variable (en inglés “*unpredictable chronic mild stress*” el cual consistió en la exposición de los animales del grupo estrés durante 5 semanas a factores que incluyeron 24 h de privación de comida, 24 horas de privación de agua, jaula a 45 °C, inclinación durante 24 h, agitación durante 2 h, 5 min natación fría (a 4 ° C), 2 h de sujeción física, 24 h de caja mojada e iluminación nocturna, uno por día en un orden aleatorio), media comportamientos del tipo depresivos en ratas estresadas a través del aumento de la expresión del microARN miR-134, dentro de la corteza prefrontal ventro-medial (CPfvm), y este efecto es paralelo a la disminución de los niveles de expresión y fosforilación de la proteína LIMK1 y la proteína efectora aguas abajo, cofilina (Fan et al., 2018). En concordancia, estudios más recientes, reportaron que la exposición durante 3 semanas a estrés crónico leve (en inglés “*chronic mild stress*” el cual consistió en 14 factores estresantes: reversión diurna y nocturna durante 24 h; ayuno de 24 h; unión durante 2 h; depravación de agua 24 h; basculante durante 24 h; jaula vacía durante 24 h; nado en agua helada durante 5 minutos; ruido durante 2 h; agitación durante 5 min; caja mojada durante 24 h; estimulación térmica; olor peculiar durante 24 h (diferente para cada semana); sacudida durante 1 min y exposición a un cuerpo extraño durante 24 h (diferente para cada semana), dos estímulos fueron seleccionados al azar cada día, y cada método se utilizó 2-3 veces, durante 21 días) regula negativamente la expresión de p-cofilina y cofilina en hipocampo (Y. Lu et al., 2019), mientras que Gao y col (Gao et al., 2020) reportaron que la señalización de LIMK1 y cofilina en la CPf media tiene un papel relevante en los efectos depresivos inducidos por el la exposición a estrés en ratones y podría ser una nueva diana farmacológica para el desarrollo de antidepresivos (Gao et al., 2020). De esta manera, las RhoGTPasas y los reguladores directos de la dinámica de actina, como cofilina, median la interfaz entre los estímulos extracelulares en respuesta a estrés o cocaína, desencadenando la reorganización del citoesqueleto de actina en las espinas dendríticas, lo cual permite adecuar la respuesta neuronal a dicho estímulo en áreas como NA. Sin embargo, no existen evidencias claras que demuestren la existencia de un mediador molecular en común entre el estrés y la cocaína. Evidencias de nuestro laboratorio en el estudio del remodelado del citoesqueleto de actina en respuesta a estrés y cocaína, y su la participación en la expresión de la sensibilización cruzada inducida por

estrés, revelaron que la exposición a estrés crónico por inmovilización induce una disminución en los niveles de expresión de p-cofilina, y F-actina en NA core, 21 días después de la última exposición a estrés. Asimismo, observamos que en animales previamente expuestos a estrés la exposición a una dosis aguda de cocaína retorna a niveles basales los niveles de F-actina en el NA core, mientras que los niveles de expresión de p-cofilina permanecen disminuidos. Además, la expresión de la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína estuvo acompañada por el incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie subunidad GluR1, así como también, por el incremento en el tamaño de la PSD en NA core. Mientras que la inyección de Latrunculina A, una droga depolimerizante de actina que inhibe el recambio de actina, en el NA core, previno la expresión de la sensibilización conductual inducida por estrés y el incremento de receptores AMPA. Por lo cual, el estrés crónico por inmovilización induce cambios a largo plazo en la expresión de proteínas que regulan la dinámica de actina en el NA core, y estos cambios acompañan el remodelado del citoesqueleto de actina durante la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés. Además, el estrés altera la capacidad de una posterior inyección de cocaína para modular la dinámica del citoesqueleto de actina y la expresión de receptores AMPA GluR1 en el NA core.

De esta manera, la literatura abordada hasta aquí, sugiere que la plasticidad sináptica y estructural de las espinas dendríticas en el NA, es un punto clave de estudio para comprender los mecanismos moleculares que median el efecto del estrés en la vulnerabilidad a la adicción.

El presente trabajo de tesis tiene como finalidad el estudio del impacto del estrés en la vulnerabilidad al consumo de cocaína. En particular, en este trabajo nos proponemos evaluar si el estrés crónico por inmovilización induce alteraciones en las espinas dendríticas a través de la desregulación de la RhoGTPasa Rac1 y la proteína cofilina en el NA core y su impacto en la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducido por estrés. Además, evaluamos si los mecanismos neurobiológicos que modulan la administración repetida de cocaína también ocurren en un modelo de AA de cocaína inducida por estrés crónico.

# OBJETIVOS

**OBJETIVO GENERAL**

La exposición a situaciones traumáticas es un factor de riesgo en el desarrollo de adicciones a drogas de abuso, así como también es un fuerte disparador de reincidencia al uso de drogas, incluso luego de años de abstinencia (O'Doherty, 1991; P. Ouimette et al., 2007). Respaldo estas observaciones, el uso de modelos animales de adicción permitió demostrar que la exposición a situaciones estresantes incrementa la sensibilización a los efectos estimulantes motores y gratificantes de los psicoestimulantes, así como también, facilita la adquisición de la conducta de AA de la droga y el mantenimiento de la conducta a lo largo del tiempo (Boyson et al., 2012; P. V. Piazza et al., 1990), apoyando la existencia de una interacción facilitadora entre el estrés y el desarrollo de la adicción (Boyson et al., 2012; P. V. Piazza et al., 1990).

Una hipótesis considerada por algunos autores propone que la exposición a estrés modifica sistemas neurobiológicos que participan en las respuestas de recompensa y reforzamiento, planteado la posibilidad de que tanto las drogas como el estrés actúan sobre sustratos neurobiológicos comunes (P. V. Piazza & Moal, 1998). En este sentido, se describió que tanto la administración repetida de psicoestimulantes, como la exposición a estrés inducen adaptaciones a nivel de las sinapsis excitatorias que implican modificaciones en la morfología y en la densidad de espinas dendríticas en regiones límbicas del cerebro, como hipocampo, amígdala y núcleo accumbens (NA) (S. M. Brown et al., 2005; H. Shen et al., 2009; Toda et al., 2006). Específicamente, el consumo repetido de cocaína, induce una reorganización neuronal persistente en NA (Russo et al., 2010) y estas alteraciones son las responsables de la respuesta conductual y la mayor sensibilidad a los efectos de recompensa de la droga (Dietz et al., 2012; H. Shen et al., 2009; Toda et al., 2006; Verma et al., 2019). Por lo cual, las espinas dendríticas constituyen el sitio blanco de los cambios plásticos dependientes de las diferentes experiencias (Penzes & Rafalovich, 2012; Robinson & Kolb, 2004; Russo et al., 2010).

El remodelado de las espinas dendríticas depende de la dinámica del citoesqueleto de actina (Dos Remedios et al., 2003). El ensamblado y desensamblado de actina regula la morfología de las espinas dendríticas y la inserción de proteínas en la densidad postsináptica (PSD), lo cual está asociado con alteraciones en la fuerza sináptica (Dietz et al., 2012; Matus, 2005; Russo et al., 2010; H. Shen et al., 2009; Toda et al., 2006; H. Wang et al., 2005). Varias cascadas de señalización intracelular que involucran la

regulación de las RhoGTPasas están implicadas en la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas (Hering & Sheng, 2001; Stankiewicz & Linseman, 2014). Particularmente, la activación de Rac1 estimula la polimerización y estabilización de las espinas dendríticas a través de la activación de los efectores cascada abajo PAK (p21activated kinase), LIMK1 (LIM kinase I) y la proteína de unión a actina, cofilina, mientras que la cascada de señalización RhoA/ROCK promueve la desestabilización y reducción de la densidad de las espinas dendríticas (Penzes & Rafalovich, 2012).

Uno de los mecanismos moleculares estudiados en respuesta a la administración de cocaína en NA propone que el tratamiento repetido con la droga regula negativamente la actividad de la RhoGTPasa Rac1, y esto promueve el incremento de la actividad de la proteína cofilina, siendo estas alteraciones las responsables de los cambios plásticos observados en el NA y de la mayor sensibilidad a los efectos de recompensa de la droga (Dietz et al., 2012). Consistentemente con este estudio, evidencias de otro laboratorio demuestran que la actividad de la proteína Rac1 es regulada diferencialmente en NA y Caudado putamen (Cpu) luego del tratamiento crónico con cocaína, poniendo de manifiesto la complejidad de la regulación de la RhoGTPasa Rac1 *in vivo* y su participación en el remodelado de las espinas dendríticas y la plasticidad sináptica observada en ambas estructuras luego de la cocaína (J. Li et al., 2015).

Estudios de nuestro laboratorio en modelos animales de comorbilidad entre la exposición a estrés y la adicción a cocaína, revelan la existencia de adaptaciones neurobiológicas duraderas en las sinapsis glutamatérgicas del NA, que subyacen al desarrollo de la sensibilización conductual (Esparza et al., 2012; Garcia-Keller et al., 2013) y facilitan la adquisición de la AA de cocaína, alcohol y heroína (SA) (Carter et al., 2020; Garcia-Keller et al., 2016; Garcia-Keller, Smiley, et al., 2019). Nuestros hallazgos demuestran que la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés crónico está acompañada del remodelado del citoesqueleto de actina en NA core, cuyos cambios están mediados por variaciones en los niveles de expresión de proteínas que participan en la regulación de la dinámica de actina, como p-cofilina (Esparza et al., 2012). Estos cambios en la dinámica de actina, además se correlacionan con un aumento el tamaño de la densidad postsináptica (PSD) y un incremento en la expresión de receptores AMPA (subunidad GluR1) de superficie en NA.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y las evidencias que señalan la existencia de mecanismos de acción comunes en la comorbilidad entre el estrés y la cocaína, en el presente estudio planteamos la hipótesis que propone que la exposición a estrés crónico por inmovilización regula negativamente la actividad de la RhoGTPasa Rac1 y es responsable de la expansión de las espinas dendríticas, a través de un mecanismo mediado por cofilina, en neuronas del NA core. Es por ello, que el objetivo principal del presente estudio es proporcionar evidencia de la participación de la vía de señalización que involucra a la RhoGTPasa Rac1 y la modulación de la actividad de cofilina inducidos por estrés en los cambios estructurales de las espinas dendríticas del NA core, que contribuyen con el impacto de la vulnerabilidad a la adicción a cocaína inducida por estrés.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **1. Caracterizar la función de la proteína cofilina en el modelo de sensibilización motora a cocaína inducido por exposición a estrés crónico y su asociación con la adquisición de la conducta de autoadministración de la droga**

Investigaciones previas describieron la participación de la proteína cofilina en el remodelado dendrítico en el NA asociado a la administración crónica de cocaína y su influencia en el mayor sensibilidad observada a la droga luego de un periodo de abstinencia (Dietz et al., 2012). Antecedentes de nuestro laboratorio reportaron que la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por la exposición a estrés crónico depende del remodelado del citoesqueleto de actina. Específicamente, Esparza y col (Esparza et al., 2012) demostraron que la exposición a estrés crónico por inmovilización induce una reducción en los niveles de expresión de la proteína p-cofilina en NA core, conjuntamente con los niveles de F-actina, luego de un período prolongado de tiempo. Mientras que, luego de una inyección no-contingente de cocaína los niveles de F-actina se restablecen, y los niveles de expresión de p-cofilina permanecen reducidos, sugiriendo que la expresión de la sensibilización a cocaína se acompañada del remodelado dendrítico, e involucra variaciones en la expresión de proteínas que regulan de manera directa la dinámica del citoesqueleto de actina (Esparza et al., 2012).

Considerando los antecedentes mencionados, este objetivo propone evidenciar la participación de la cofilina, una proteína de unión a actina, en la expresión de la

sensibilización motora a cocaína inducida por estrés y analizar el impacto de la desregulación de la actividad de cofilina, ocasionada por la exposición a estrés, en un modelo adquisición de la conducta de AA de cocaína. Para lo cual, utilizamos un lentivirus que expresa un RNA de interferencia específico (shRNA en inglés “*short hairpin RNA*”) dirigido contra la secuencia de ARN mensajero (ARNm) de cofilina de rata, para inhibir la expresión de esta proteína en NA core y tres semanas después evaluamos la función de cofilina en la expresión de la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína y durante la adquisición de la conducta de AA de cocaína inducida por estrés.

## **2. Caracterizar la función de cofilina en los cambios plásticos en la postsinapsis glutamatérgica en el NA core inducidos por estrés crónico luego de la administración de cocaína**

La neurotransmisión excitatoria mediada por receptores glutamatérgicos de tipo AMPA en el NA es necesaria para las adaptaciones conductuales observadas luego de la exposición a cocaína (Boudreau & Wolf, 2005). El tráfico de receptores AMPA en las sinapsis excitatorias es un mecanismo importante que regula la fuerza sináptica durante fenómenos de plasticidad (Bredt & Nicoll, 2003; Malenka & Nicoll, 1999; Malinow & Malenka, 2002; Turrigiano & Nelson, 2004). Así, el incremento de receptores AMPA de superficie en el NA luego de la administración crónica de cocaína se encuentra implicado en el fenómeno de sensibilización conductual (Boudreau & Wolf, 2005).

El estado de polimerización de actina en las espinas dendríticas influencia la localización y el tráfico de receptores AMPA (Kruijssen & Wierenga, 2019). Específicamente, el incremento en la polimerización y la estabilización de los filamentos de actina favorece la expresión de receptores AMPA en superficie (Allison et al., 1998). Por el contrario, la depolimerización de actina estimula la remoción de los receptores AMPA de los espacios sinápticos (Allison et al., 1998; Boudreau & Wolf, 2005; Q. Zhou et al., 2001). Estudios previos de nuestro laboratorio reportaron que durante la expresión de la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína se produce un aumento en la expresión de receptores AMPA GluR1 de superficie en el NA core de animales previamente expuestos a estrés crónico y dicho aumento es prevenido por el tratamiento con Latrunculina A, droga capaz de unirse a G-actina previniendo su polimerización en F-actina (Esparza et al., 2012). A partir de estos antecedentes, este objetivo pretende evaluar la influencia de la desregulación de cofilina en NA core en la expresión de receptores

AMPA de superficie inducida por una inyección no-contingente de cocaína en animales previamente expuestos a estrés crónico. Para ello, utilizando la misma estrategia molecular, luego de la inyección del lentivirus que expresa el shRNA de cofilina en NA core, analizamos la expresión de superficie de membrana del receptor AMPA por biotilación y posterior inmunotransferencia utilizando un anticuerpo dirigido contra la subunidad GluR1 del receptor AMPA.

### **3. Caracterizar la influencia de cofilina sobre la morfología de las espinas dendríticas en NA core durante la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés**

La plasticidad estructural dependiente de la experiencia involucra adaptaciones a largo plazo en las sinapsis excitatorias que subyacen a varios síndromes psiquiátricos (Penzes & Rafalovich, 2012; Robinson & Kolb, 2004; Russo et al., 2010). Por ello, se ha propuesto que los cambios morfológicos en las espinas dendríticas de las neuronas que comprenden los circuitos de recompensa están involucrados en las respuestas conductuales duraderas observadas en trastornos como la adicción a drogas de abuso (Dietz et al., 2012; Russo et al., 2010). Evidencias previas describieron que la administración crónica de psicoestimulantes y la exposición a estresores inducen alteraciones tanto en la densidad de espinas dendríticas, así como también en la morfología de las espinas y complejidad de la ramificación dendrítica en NA (Christoffel, Golden, Dumitriu, et al., 2011; Dietz et al., 2012; Robinson & Kolb, 1997; Russo et al., 2010). Además, estudios más recientes reportaron una relación entre el diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas y la potenciación sináptica transitoria inducida por drogas de abuso y estrés. Considerando que la proteína cofilina es un regulador directo de la dinámica de actina en las espinas dendríticas, en este objetivo evaluamos la influencia de la desregulación de la proteína cofilina en los cambios estructurales de las MSNs del NA inducidos por la exposición a estrés crónico luego de la cocaína y su asociación con los cambios conductuales observados. Para ello, analizamos la morfología de las espinas dendríticas y su densidad en las MSNs del NA core, conjuntamente con los cambios en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas del NA core, a través de microinyecciones del colorante DiI en cortes fijados de cerebro de animales, 24 h después de una inyección aguda de cocaína (15 mg/kg i.p.) o salina, tres semanas después de la última exposición a estrés.



#### **4. Caracterizar la función de la proteína Rac1 en la señalización inducida por estrés en NA core durante la expresión de la sensibilización motora a cocaína**

Estudios previos reportaron que la administración crónica de cocaína regula negativamente la actividad de la proteína Rac1 en el NA, lo cual resulta en el aumento de la actividad de la proteína cofilina, y estas alteraciones moleculares son las responsables de la mayor sensibilidad a los efectos de recompensa de cocaína (Dietz et al., 2012). En esta misma línea, otro trabajo describió que la administración crónica de cocaína induce la activación de la proteína Rac1 en NA y Cpu de manera diferencial, y esto es responsable de los cambios plásticos observados en ambas estructuras luego de la cocaína (J. Li et al., 2015). A partir de estos antecedentes, este objetivo propone caracterizar la función de Rac1 en el modelo de sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés, basándonos en la hipótesis de que la exposición a estrés podría regular negativamente la actividad de la proteína Rac1 en NA core, influenciando la expresión de la sensibilización conductual a cocaína. A tal fin, generamos una serie de vectores lentivirales que expresan una mutante de Rac1 constitutivamente activa, incapaz de unirse a GDP, denominada Rac-CA o Rac1 G12V y una mutante de Rac1 dominante negativa, incapaz de ciclar e incorporar GTP, denominada Rac1-DN o Rac1 T17N. Estos vectores se microinyectaron en NA core y dos semanas después evaluamos la influencia de Rac1 en la expresión de la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína.

#### **5. Caracterizar la función de la proteína Rac1 en los cambios plásticos en la postsinapsis glutamatérgica en el NA core inducidos por estrés crónico luego de la administración de cocaína**

El incremento en la expresión de receptores AMPA luego de la administración de cocaína es uno de los mecanismos propuestos para explicar el incremento en la sensibilización conductual a cocaína (Boudreau & Wolf, 2005; Pierce et al., 1996; Suto et al., 2004) Considerando que la actividad de la proteína Rac1 es sugerida como posible mecanismo molecular por el cual la cocaína ejerce su acción y permite los cambios plásticos que acompañan la respuesta conductual, en este objetivo proponemos evaluar la función de Rac1 en la expresión de receptores AMPA de superficie en NA core, durante la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés. Para tal fin, utilizamos un lentivirus que favorece la expresión de la proteína Rac1 en la forma activa, unida a GTP

(LV Rac-CA), y evaluamos su participación en la expresión de receptores AMPA de superficie luego de la cocaína en animales previamente expuestos a estrés crónico. Para ello, las determinaciones se llevaron a cabo mediante biotinilación y posterior inmunotransferencia utilizando un anticuerpo dirigido contra la subunidad GluR1 de los receptores glutamatérgicos del tipo AMPA.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## GENERALIDADES

### Animales

Los experimentos se realizaron en ratas macho de entre 250-300g de la cepa Sprague-Dawley provenientes del Bioterio del Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos - CIPReB Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Los animales se hospedaron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, donde se agruparon de a cuatro animales en cajas de 12x30x50 cm. Se asignaron al azar a los diferentes grupos experimentales al cumplir los 2 meses de edad ( $\pm 1$  semana) y se mantuvieron en condiciones estándar de  $22^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  bajo un ciclo luz/oscuridad de 12 h (comenzando el ciclo de luz a las 7:00 h), con libre acceso a alimento y agua. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con el National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (RES HCD 1220/18) y se realizaron durante el ciclo de luz, con excepción de los experimentos de AA en cuyo caso los animales se confinaron a ciclo de oscuridad durante todo el experimento.

### Estrés por inmovilización

Los animales se asignaron en dos grupos denominados, estresados (E) y no estresados (NE). Los animales correspondientes al grupo estrés, fueron inmovilizados en cilindros de plexiglás 2 h por día, durante siete días consecutivos entre las 10:00 y las 14:00 h (Capriles & Cancela, 1999). Los cilindros de plexiglás se diseñaron de forma tal que los animales puedan respirar normalmente y mover libremente la cola. Durante todo el protocolo de estrés, se controló el peso y pelaje de los animales, los cuales mostraron un aspecto saludable (Cancela et al., 1996). El grupo de animales no estresados se mantuvo en sus cajas sin ninguna manipulación, excepto para el pesaje semanal y el aseo de cajas. Posteriormente, los animales fueron asignados al azar para los estudios conductuales, bioquímicos, y moleculares.

## CONSTRUCTOS DE DNA

### RNA de interferencia de la proteína cofilina

Un RNA de interferencia (shRNA en inglés “*short hairpin RNA*”) fue diseñado para llevar a cabo el silenciamiento génico de la proteína cofilina de rata en base a los protocolos establecidos en Cáceres y Chung (Chuang et al., 2013), el cual posteriormente fue empaquetado en particulares lentivirales para su infección *in vivo*. Para la construcción génica del shRNA de cofilina se utilizó el plásmido pSilencer 1.0 U6, el cual cuenta con un promotor RNA polimerasa III. EL shRNA de cofilina fue diseñado a partir de dos secuencias, sentido y antisentido, de entre 19 a 21 nucleótidos con secuencias idéntica al ARNm de la proteína cofilina de rata unidos por una región de bucle. Para su construcción fueron utilizadas las secuencias 5’gggcaaggagattctgtagg y 3’ctaccagaatctccttgccc como secuencias de orientación siguiendo los procedimientos descritos por Cáceres y Chung (Chuang et al., 2013). Los fragmentos doble hebra bajo la dirección del promotor U6 (denominados U6-cofilina-shRNA y U6-control-shRNA) fueron cortados en los sitios de restricción de la enzima XbaI y fueron ligados en el plásmido pLentiLox 3.7 (Invitrogen). El plásmido pLentiLox 3.7 (Invitrogen) se caracteriza por estar conformado por un promotor de citomegalovirus (CMV) que permite la expresión de la proteína fluorescente soluble de color verde (GFP en inglés “*green fluorescent protein*”) (Bisbal et al., 2008). Como resultado final se obtuvieron dos plásmidos bistrónicos denominados: shRNA-cofilina-GFP y shRNA-control-GFP, que expresaron la secuencia de interés para llevar a cabo el silenciamiento génico de la proteína cofilina o la secuencia no codificante, bajo la dirección del promotor U6 y, la proteína fluorescente soluble verde, bajo la dirección del promotor CMV. El constructo génico no codificante (scramble) que se utilizó para el shRNA de interferencia control fue adquirido de Ambion. Todos los plásmidos fueron empaquetados en lentivirus para su infección *in vivo*.

### Mutaciones de la proteína Rac1

Dos plásmidos con mutaciones de la proteína Rac1 fueron diseñados para modificar la capacidad de activación o inactivación de la proteína sintetizada *in vivo*. Para ello, a partir de los plásmidos Rac1G12V pcDNA3 y Rac1T17N pcDNA3 se obtuvieron los fragmentos con las secuencias mutadas de Rac1, denominadas: (1) secuencia constitutiva activa (CA), una mutación en el dominio G12V de la proteína Rac1, la cual

induce un estado de activación permanente de la proteína sintetizada a través de la unión a GTP (Rac1-GTP), y (2) secuencia dominante negativa (DN), una mutación en el dominio T17N, la cual induce un estado de inactivación permanente de la proteína sintetizada a través de la unión a GDP (Rac1-GDP). Los fragmentos obtenidos de RacG12V (CA) y RacT17N (DN) fueron incorporados al plásmido pFCVI I, digerido previamente con la enzima XhoI. Luego, se confirmó la correcta orientación de las secuencias mediante corridas electroforéticas, así como también la expresión de ambas mutaciones *in vitro* mediante la transfección de los plásmidos en cultivos de líneas celulares. Los plásmidos resultantes se denominaron: pRac1-CA, pRac1-DN. Estos plásmidos (pRac1-CA y pRac1-DN) quedaron conformados por un promotor de ubiquitina para su expresión en células eucariotas, un epítipo que corresponde a nueve nucleótidos de la hemaglutinina (HA), que permite mediante el uso de anticuerpos específicos su detección y un promotor IRES que permite la expresión de una proteína fluorescente amarilla (YFP en inglés “*yellow fluorescent protein*”). Como control se utilizó una secuencia no codificante, la cual fue incorporada al plásmido pFCVI I.

### GENERACIÓN DE PARTICULAS VIRALES

Los plásmidos shRNA-cofilina-GFP, shRNA-control-GFP, pRac1-CA, pRac1-DN y pFCVI I fueron utilizados para generar partículas virales (lentivirus, siglas, LV) en cultivos de líneas celulares HEK293T. Para ello, cápsulas de cultivos de células HEK293T de 60mm a un 80% de confluencia se co-transfectaron con el plásmido de interés y tres plásmidos de empaquetamiento que aportan, en trans, las proteínas estructurales y replicativas necesarias para la producción del lentivirus mediante el método de lipofectamina 2000 en medio de cultivo libre de suero, previamente agregado, durante 4 h a 37°C. Se utilizaron las siguientes relaciones 2: 2 :1 (10 µg de ADN total) para el caso de los plásmidos shRNA-cofilina-GFP, shRNA-control-GFP y 5: 1:1 (10 µg de ADN total) para el caso de los plásmidos pRac1-CA, pRac1-DN y pFCVI I. Transcurridas las 4h de transfección el medio de cultivo fue remplazado por medio con suero al 10% y las células se dejaron durante 48h en el incubador a 37°C sin perturbar. El medio de cultivo se recogió en tubos estériles a las 48 h y se les adicionó nuevo medio a los cultivos, el cual se recogió 24 h después (72 h post transfección). Los medios de cultivos obtenidos conservados a 4°C se dividieron en eppendorff de 1.5ml y se

centrifugaron a 13.000g durante 3 h. Se descartó el sobrenadante obtenido y el pellet se resuspendió en solución fisiología estéril, y se conservó a -80 ° C hasta su utilización. Los lentivirus (LV) generados se denominaron de la siguiente manera: LV-shCtrl, LV-shcofilina, LV-Ctrl, LV-Rac CA y LV-Rac DN.

## CIRUGÍAS

### **Microinyecciones intracraneales de lentivirus**

Los animales fueron anestesiados con ketamina/xylazina (55 mg/kg y 11 mg/kg i.p., respectivamente) y colocados en un estereotáxico (Stoelting). La barra incisiva dental se ubicó a 3,3 mm por debajo de la línea interaural. El cráneo se expuso mediante una incisión en el cuero cabelludo y se perforaron dos agujeros en la superficie del cráneo para la microinyección de las partículas lentivirales bilateralmente en NA core. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas para NA core fueron: anteroposterior (AP): +1.6mm, lateral (L):  $\pm 1.5$  mm; dorsoventral (DV): -6.6mm, tomadas del atlas Paxinos y Watson (Paxinos G & Watson C., 2007) y las mediciones de las mismas fueron realizada desde el cráneo y con respecto de bregma. La inyección de las partículas lentivirales fue realizada con un inyector, el cual fue elaborado previamente con una aguja 22G conectado a una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l (Reno, NV, EE. UU.) a través de un catéter de polietileno (P10, Becton Dickinson, MD, EE. UU.). Se infundió 1ul de virus en NA core bilateralmente durante 5 min a una velocidad de 0.05ul/min. Después de la infusión, el inyector permaneció en los sitios infundidos durante 5 min para evitar el retroceso del virus. Por último, se suturó la piel y los animales fueron transferidos a cajas con libre acceso agua y comida para su recuperación antes de comenzar con los experimentos. La correcta localización de las microinyecciones realizadas en NA core fue verificada para todos los procedimientos experimentales, después de las pruebas de comportamiento y durante la toma de muestras para las pruebas bioquímicas.

### **Implantación de catéteres permanentes**

Una semana después de las microinyecciones de las partículas virales del RNA de interferencia de cofilina (LV-shcofilina) o el control (LV-shCtrl) en NA core, los animales fueron anestesiados con ketamina / xilazina (55 mg/kg y 11 mg/kg, i.p. respectivamente) y se implantaron catéteres permanentes en la vena yugular derecha para los experimentos de adquisición de la conducta de AA de cocaína. Los catéteres se

elaboraron con un tubo de polietileno de 13 cm de longitud ajustado a una cánula guía doblada en ángulo recto y revestido de cemento dental anclado con una malla de polipropileno, de 2 x 2 cm y se esterilizaron mediante su exposición a calor previamente a su implantación. El tubo del catéter se pasó por vía subcutánea desde la espalda del animal hasta la vena yugular derecha para su implantación. Luego de su colocación y hasta que finalizó el procedimiento experimental, los catéteres fueron lavados diariamente con aproximadamente 0,1 ml de solución salina fisiológica estéril que contenía heparina (30 unidades USP/ml) para evitar la formación de coágulos sanguíneos. Además, los animales operados recibieron dosis diarias de antibiótico y analgésico durante 7 días consecutivos para evitar infecciones, dicho tratamiento se suprimió antes de comenzar el experimento conductual.

## ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

### **Inmunotransferencia**

Se disecaron muestras de tejido del NA y se prepararon en buffer de siembra 4X o 2X suplementado con inhibidores de proteasas (aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina A 1 µg/ml, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y ortovanadato de sodio 1 mM como inhibidor de fosfatasa) respectivamente. Para todos los experimentos se juntaron las secciones bilaterales de NA correspondientes a un animal, y se consideraron como un único N para su cuantificación. Las muestras fueron sembradas y separadas en geles de SDS-PAGE (8-15%) y posteriormente, transferidas a membranas de PVDF (Fluoruro de polivinilideno, Amersham Hybond-P de GE Healthcare). Dichas membranas se lavaron varias veces con buffer TBS-Tween 0.05% (20 mM Tris, 150 mM NaCl, Tween-20 0.05%, pH 7.6), y luego fueron incubadas con albumina sérica bovina al 5% preparada en TBS-Tween 0.05% durante 1 h a 37° C, para reducir las uniones inespecíficas. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario preparado en una solución de albumina sérica bovina al 1 % en TBS-Tween 0.05%. Al día siguiente las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.05% para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (según la especie del anticuerpo primario utilizado previamente). Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron 3 a 5 lavados con TBS-



Tween 0.05% para quitar el exceso de anticuerpo. El revelado de las membranas se llevó a cabo mediante la técnica de quimioluminiscencia con luminol, ácido cumárico como catalizador y peróxido de hidrógeno como sustrato de reacción (ECL). El revelado fue plasmado en placas de rayos X (AGFA). Finalmente, el resultado obtenido en las placas de revelado fue escaneado para su análisis y cuantificación utilizando el programa Image J. La cuantificación de la señal mediante el uso del Image J, consistió en medir la densidad óptica para cada banda estableciendo la relación entre los valores obtenidos para la proteína de interés y los valores de densidad óptica de  $\alpha$ -tubulina utilizada como control de siembra.

### **Biotinilación de las proteínas de superficie**

Los animales recibieron una inyección aguda de solución salina o cocaína (15 mg/kg i.p.) y fueron decapitados 45 min después a fin de evaluar la expresión de los receptores AMPA en superficie (n=4-6/grupo). El NA (conteniendo tanto el core como el shell) fue disecado y las secciones bilaterales de tejido obtenidas de un animal se agruparon para obtener material suficiente para evaluar la expresión de receptores de superficie. El tejido disecado se incubó con biotina (sulfosuccinimidil-6-[biotina-amido] hexanoato, Pierce) en buffer fosfato salina (PBS) (0.3 mg/ml) durante 1 h a 4°C, y posteriormente se lavó durante 5 min con una solución fría de Tris-glicina a fin de detener la reacción, seguido de tres lavados con buffer Tris-salina frío (TBS, 3x 5min) para eliminar los restos de biotina. Luego, el NA biotinilado se homogenizó en 300  $\mu$ l de buffer RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón-X100 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%) y los homogenatos obtenidos se centrifugaron a 13.000g durante 30 min para separar la fracción insoluble. Para la fracción total de GluR1 (superficie + interno), 50  $\mu$ l del sobrenadante se mezclaron e hirvieron con buffer de siembra 4X para su posterior determinación. Las proteínas de superficie biotiniladas en el remanente de sobrenadante (200  $\mu$ l) se inmunoprecipitaron con 50  $\mu$ l de avidina 50% (adherida a esferas de agarosa) durante 2 h a 4 °C. Las esferas de agarosa (pellet) se separaron del sobrenadante y se lavaron tres veces con TBS. Posteriormente se hirvieron con 50  $\mu$ l de buffer de siembra 2X (fracción de superficie). La fracción de superficie y la fracción total de GluR1 (superficie + interna) fueron analizadas por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-GluR1. Los receptores AMPA asociados a membrana fueron definidos como la fracción de superficie de GluR1 eluída a partir de las esferas de agarosa y expresados como la relación respecto de la fracción total de GluR1 (superficie + interna). Cada

fracción fue normalizada respecto de  $\alpha$ -tubulina y luego la fracción de superficie de GluR1 fue normalizada respecto de la fracción interna. Todos los buffers utilizados durante el experimento contenían inhibidores de proteasas (aprotinina 2  $\mu\text{g/ml}$ , leupeptina 10  $\mu\text{g/ml}$ , pepstatina A 1  $\mu\text{g/ml}$ , fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y ortovanadato de sodio 1 mM como inhibidor de fosfatasas).

### **ESTUDIOS CONDUCTUALES**

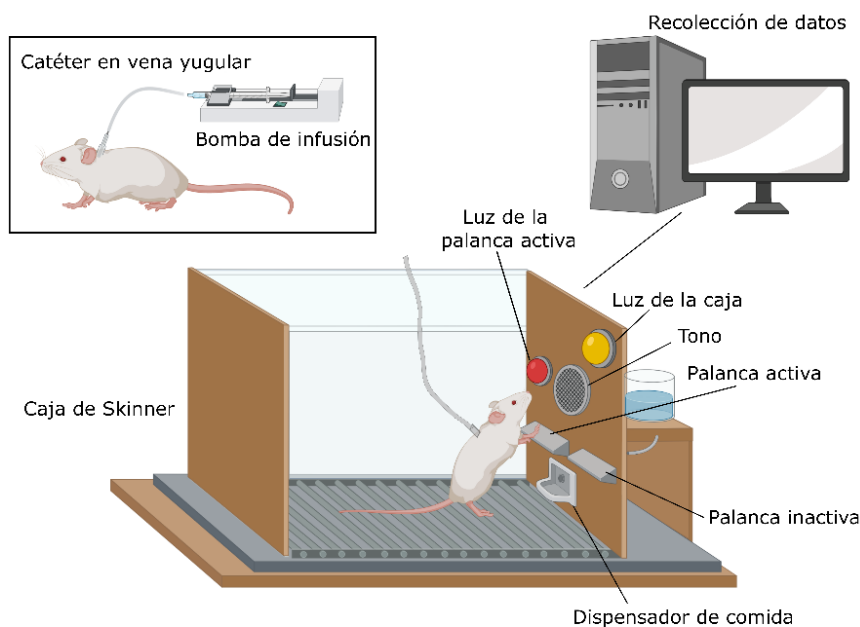
#### **Registro de actividad locomotora**

Luego de tres semanas de realizadas las inyecciones intracraneales de las partículas virales del RNA de interferencia de cofilina (LV-shcofilina) y su respectivo control (LV-shCtrl) en animales estresados y no-estresados, fue registrada la actividad locomotora frente a una dosis de cocaína de 15 mg/kg. En otro experimento, luego de transcurrida una semana de las inyecciones intracraneales de las partículas virales de Rac1 (LV-Rac CA y LV-Rac DN) y su control (LV-Ctrl), fue registrada la actividad locomotora frente a una dosis desafío de cocaína de 10mg/kg. En cada caso la actividad locomotora fue monitoreada en cajas rectangulares (30,5 x 19,5 x 46, 5 cm<sup>3</sup>) equipadas con dos fotocélulas de rayos infrarrojos localizados 3 cm por encima del piso conectados a una computadora. Los registros de actividad locomotora de los animales fueron cuantificados como el número total de cuentas (la interrupción de un rayo resulta en una cuenta) cada 10 min. Los animales fueron habituados durante 30 min y posteriormente recibieron una inyección solución salina estéril i.p. y fue monitoreada la actividad motora durante 60 min. Luego cada animal recibió una inyección de cocaína (10 mg/kg o 15 mg/kg i.p.) y fue monitoreada la actividad motora durante 120 min.

#### **Cajas de condicionamiento operante**

Los experimentos de adquisición de la conducta de AA de cocaína y sacarosa oral fueron realizados en cajas de condicionamiento operante (Med Associates, USA) colocadas en un cubículo ventilado con atenuación de sonido. Cada cámara operante está equipada con dos palancas denominadas palanca activa y palanca inactiva. Para los experimentos de adquisición de la conducta de AA de cocaína, los animales son conectados a las cajas a través de una cánula guía con sistema de rosca (procedimiento de implantación descripto en cirugía de catéteres), la cual se encuentra asociada directamente a una bomba de infusión para la entrega de la droga por vía intravenosa. Durante el

experimento, la presión de la palanca activa por parte de los animales, resulta en la activación de la bomba de infusión conectada a través de un tubo de silicona a una jeringa que contiene cocaína y produce el refuerzo de la conducta bajo una razón fija (FR) igual a 1 (una presión de la palanca activa se reforzó con una entrega de droga). La presión de la palanca activa está asociada a la activación de una luz indicadora y un altavoz (tono) ubicados por encima de la palanca. Las respuestas en la palanca inactiva son registradas, pero los animales no reciben una infusión de la droga, es decir que la presión de la palanca inactiva no es reforzada con la droga. Para los experimentos de adquisición de la conducta de sacarosa oral, los animales son colocados en las cajas de condicionamiento donde la presión de la palanca activa está asociada a la entrega de sacarosa oral, a través de un comedero ubicado en el centro de la pared izquierda de la caja, entre la palanca activa e inactiva, bajo un esquema de FR1. La presión de la palanca activa está asociada a la activación de una luz indicadora y un altavoz (tono) ubicados por encima de la palanca. Para ambos experimentos, la luz de la caja se enciende al comienzo de cada sesión de prueba. La programación de experimentos y la recopilación de datos fueron realizados utilizando el software Med Associates. La **Figura 8** es una imagen representativa de las cajas de condicionamiento operante utilizadas durante el experimento de adquisición de la conducta de AA.



**Figura 8.** Imagen representativa de una caja de condicionamiento operante utilizada durante el experimento de adquisición de la conducta de autoadministración.

### Autoadministración de cocaína

Ocho días después de la implantación de catéteres permanentes en la vena yugular derecha, los animales comenzaron sesiones diarias de 2 h de adquisición de la conducta de AA de cocaína bajo una FR1, en la que la depresión de la palanca activa es reforzada con una infusión de cocaína (0.3 mg/kg/infusión, seguido de un período de tiempo de espera de 10 segundos, en inglés “*time out*”). Este procedimiento es acompañado con el encendido de una luz blanca ubicada por encima de la palanca activa y una señal de tono discreto. Durante el período de infusión se registran presiones adicionales en la palanca activa pero las mismas no conducen a la infusión de la droga durante el periodo de *time out*. La palanca inactiva está disponible durante toda la sesión, aunque la presión de esta palanca no es reforzada con una infusión de la droga. Durante todo el periodo de espera de 10 segundos, *time out*, la luz indicadora de la palanca activa, la luz de la caja y el tono se apagan y la luz de la caja se enciende nuevamente cuando el animal puede recibir una nueva recompensa. Los animales son entrenados durante 10 días consecutivos. El criterio de adquisición de la conducta de AA de cocaína se establece cuando los animales obtuvieron 15 o más infusiones de cocaína durante al menos dos días consecutivos. Por último, los animales que durante el experimento de AA realizan más de 30 presiones de la palanca inactiva son descartados del experimento (Garcia-Keller et al., 2013).

### **Autoadministración oral de sacarosa**

Ocho días después de las microinyecciones intracraneales de las partículas virales del RNA de interferencia de cofilina (LV-shcofilina) o de su control lentiviral (LV-shCtrl) en NA core, los animales comienzan sesiones diarias de adquisición de la conducta de AA de sacarosa oral bajo una FR1, durante 1 h por día y durante 10 días consecutivos. Las condiciones experimentales para la realización de las pruebas de AA de sacarosa oral son idénticas a las utilizadas para la AA de cocaína, excepto por lo siguiente: (1) no se realizan cirugías de implantación de catéteres en este experimento, (2) la presión en la palanca activa es reforzada con la entrega de 0.1 ml de solución de sacarosa al 10% en un comedero líquido ubicado en la pared de la caja de condicionamiento operante, (3) para evitar la saciedad de la recompensa de sacarosa se establece una sesión de 1 h diaria. La presión de la palanca activa es reforzada con el suministro de solución de sacarosa al 10% durante un periodo de 10 segundos, conjuntamente con una luz blanca ubicada por encima de la palanca activa y una señal de tono discreto, seguido de un período de tiempo de espera de 10 segundos, *time out*, durante el cual todas las luces se apagan. La luz de la caja se enciende nuevamente cuando el animal puede recibir una nueva recompensa. La palanca inactiva está disponible durante toda la sesión y los datos son registrados, aunque la presión de esta palanca no es reforzada con la sacarosa. El criterio adquisición de la conducta se establece cuando los animales obtienen más de 15 ingestas de sacarosa durante al menos dos días consecutivos. Por último, los animales que durante el experimento de AA de sacarosa realizan más de 30 presiones de la palanca inactiva son descartados del experimento (You et al., 2018; H. Zhang et al., 2015).

### **HISTOLOGÍA**

Una vez finalizados los experimentos conductuales los animales fueron sacrificados y sus cerebros removidos y colocados en solución de formaldehído al 4% para su correcta fijación. Secciones coronales fueron cortadas en un criostato (Leica), y fueron examinados bajo lupa la localización de las microinyecciones. Para el análisis estadístico se utilizan solo aquellos animales en los que se observa una correcta ubicación de los sitios de inyección y no presentan signos histológicos de necrosis o hemorragia.

## ESTUDIOS MICROSCÓPICOS

### Coloración de los procesos dendríticos de las MSNs del NA core

Los animales microinyectados en NA core con el RNA de interferencia de cofilina (LV-shcofilina) y su respectivo control (LV-shCtrl) fueron anestesiados para la perfusión intracardiaca, primero con una solución PB (0.1M, pH=7.4), y luego con una solución de paraformaldehído (PFA) 1.5 %, 24 h después de una inyección aguda de salina o cocaína (15 mg/kg i.p.). Posteriormente los cerebros fueron lavados varias veces con PBS 0.1 M y seccionados con un vibrátomo en rebanadas coronales de 150  $\mu\text{m}$  de espesor. Los cortes obtenidos fueron lavados con PBS 0.1 M y almacenados a 4 °C hasta la coloración. Las secciones coronales obtenidas de NA core fueron teñidas mediante la microinyección con pipetas de patch de una solución saturada del colorante fluorescente lipofílico 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato (DiI; InVitrogen) en aceite de pescado (Pozzo-Miller et al., 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% durante 2 h a temperatura ambiente, y transcurrido ese periodo de tiempo fueron lavados con PBS para quitar el excedente de PFA. Los cortes fueron colocados sobre portaobjetos usando como medio de montaje Fluorsave (Calbiochem) y las espinas dendríticas fueron visualizadas a través de microscopía confocal.

### 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 (Carl Zeiss LSM), utilizando el objetivo de inmersión de 60X 1.42 NA. El colorante DiI fue excitado con un láser verde HeNe (543 nm). Las secciones ópticas en el eje Z se obtuvieron a intervalos de 0.1  $\mu\text{m}$  a través de las ramas dendríticas individuales.

## DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS

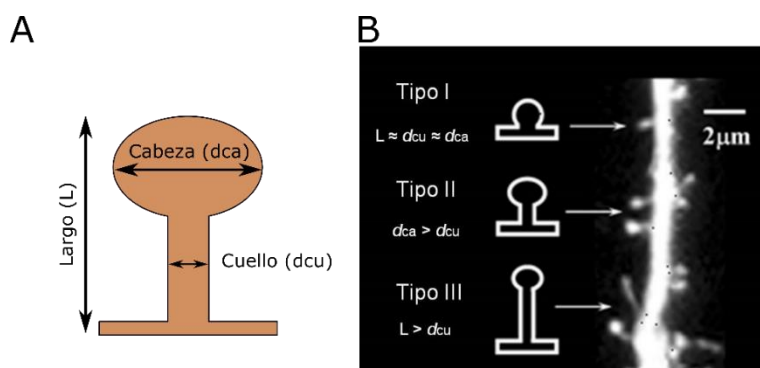
### Análisis de la Densidad de Espinas Dendríticas

La densidad de espinas dendríticas fue calculada como el número total de espinas por segmento dendrítico y normalizado por 10  $\mu\text{m}$  de dendrita. La cuantificación de las espinas dendríticas fue realizada manualmente en las proyecciones de máxima intensidad de las imágenes confocales obtenidas en el eje z con el programa *ImageJ* y fueron

identificadas como protrusiones pequeñas que se extienden no más de 3  $\mu\text{m}$  desde la dendrita parental.

### Morfología de las Espinas Dendríticas

Para la clasificación individual de las espinas dendríticas se tomaron manualmente las dimensiones de cada una de las espinas en las proyecciones de máxima intensidad de las imágenes confocales obtenidas en el eje z con el programa *ImageJ*. Las espinas dendríticas se clasificaron 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*, según las dimensiones del largo de la espina desde la base de la dendrita hasta la punta de la misma ( $L$ ), es el diámetro máximo del cuello ( $d_{cu}$ ), y es el diámetro máximo de la cabeza ( $d_{ca}$ ). Las espinas individuales fueron incluidas en cada categoría de acuerdo a la relación específica de  $L/d_{cu}$  y  $d_{ca}/d_{cu}$  (Calfa et al., 2012; Christopher A. Chapleau & Pozzo-Miller, 2008; Tyler & Pozzo-Miller, 2003).



**Figura 9. Imagen representativa de las medidas tomadas de las espinas individuales y su clasificación.** A) Espina individual en donde se encuentran marcadas las medidas tomadas para su clasificación. B) Imagen representativa de la clasificación de espinas (Christopher A. Chapleau & Pozzo-Miller, 2008; Tyler & Pozzo-Miller, 2003) de acuerdo a el diámetro de la cabeza de la espina, el diámetro del cuello de la espina y el largo total de la espina.

### DROGAS

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

### ANTICUERPOS

Los siguientes anticuerpos primarios fueron utilizados para las determinaciones de inmunotransferencia: anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra actina (1: 500; Santa Cruz Biotechnology); anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra cofilina fosforilada (serina 3) (1: 1000; provisto por el Dr James Bamburg, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA); anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra  $\alpha$ -tubulina (1: 2000; Sigma-Aldrich); anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra cofilina (1: 250; Cell Signaling), y anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra GluR1 (1: 400; Millipore).

Los siguientes anticuerpos secundarios fueron utilizados para en las determinaciones de inmunotransferencia: anti-IgG de cabra conjugado a peroxidasa (1: 2000; Jackson Laboratories); anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (1: 2000; Jackson Laboratories) y anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1: 2000; Jackson Laboratories).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software GraphPad Prism 6 (Graphpad software, La Jolla, CA). Los estudios conductuales y bioquímicos fueron analizados mediante ANOVA de una o dos vías, seguido del Test de Bonferroni para el caso de múltiples comparaciones con un alfa de 0.05% en caso de significancia. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  SEM.

Los resultados provenientes del análisis de espinas dendríticas fueron analizados con el software R studio (versión 3.5.3) y el paquete estadístico nlme (versión 3.1-148, (Pinheiro et al., 2020) y R-core 2019). Para todos los análisis fue utilizado el logaritmo de la densidad y trabajamos con un alfa de 0.05%. Para analizar las diferencias entre las medias de las densidades de espinas para cada tipo de columna, fue diseñado un modelo lineal mixto de tres factores:

$$Y_{ijklg} = \mu + D_i + T_j + Z_k + DT_{ij} + DZ_{ik} + TZ_{jk} + DTZ_{ijk} + B_l + E_{ijklg}$$

Donde:

$Y_{ijklg}$  Representa el g-th valor de densidad observado en el i-th nivel de estrés, el j-th nivel de lentivirus, el k-th nivel de droga, el l-th nivel individual,

$\mu$  es el valor general de la media de la densidad de espinas,



$D_i$  es el efecto fijo correspondiente al i-th nivel del factor estrés (con dos niveles, NE and E),

$T_j$  es el efecto fijo correspondiente al j-th nivel del factor lentivirus (con dos niveles, shCtrl y shcofilin)

$Z_k$  es el efecto fijo correspondiente del k-th nivel del factor droga (con dos niveles, Sal y Coc)

$DT_{ij}$  corresponde a la interacción entre i-th nivel del factor estrés y el j-th nivel del factor lentivirus

$DZ_{ik}$  Corresponde a la interacción entre i-th nivel del factor estrés y el k-th nivel del factor droga

$TZ_{jk}$  Corresponde a la interacción entre el j-th nivel del factor lentivirus y el k-th nivel del factor droga

$DTZ_{ijk}$  Corresponde a la interacción entre el i-th nivel del factor estrés, el j-th nivel del factor lentivirus y el nivel del factor droga

$B_l$  Corresponde al efecto random del l-th individual, por lo que se supone  $B_l \sim N(0, \sigma_b^2)$ ,

$E_{ijkl}$  El termino random, para lo cual se hacen los supuestos habituales de normalidad, independencia y homocedasticidad.

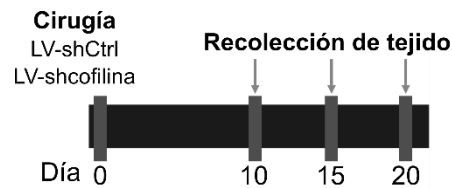
## MODELOS EXPERIMENTALES

### **Diseño experimental A: Determinación de los niveles de expresión de proteínas en NA core**

#### **Curso temporal de los niveles de expresión de las proteínas cofilina, p-cofilina, ratio de p-cofilina/cofilina y actina luego de la infección con las partículas virales del RNA de interferencia de cofilina en NA core**

Un grupo de animales seleccionado al azar fue microinyectado en NA core con el lentivirus que contiene el RNA de interferencia de cofilina (LV-shcofilina) o su respectivo lentivirus no codificante (LV-shCtrl). Luego de 10, 15, 20 y 25 días de expresión de los lentivirus, los animales fueron sacrificados y se recolectaron muestras de tejido de NA, preferentemente core, para determinar los niveles de expresión de las

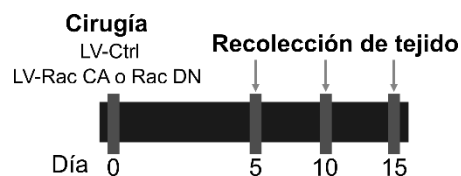
proteínas cofilina total, p-cofilina total y actina mediante inmunotransferencia. Las determinaciones de proteínas obtenidas de los animales tratados con LV-shCtrl fueron consideradas como niveles basales de expresión y representan los niveles control de proteínas.



**Figura 10.** Modelo experimental para la determinación del curso temporal de los niveles de expresión de las proteínas cofilina, p-cofilina, radio de p-cofilina/cofilina y actina luego de la infección con las partículas virales del RNA de interferencia de cofilina en NA core.

### **Curso temporal de niveles de expresión de las proteínas Rac, Cofilina, p-cofilina y Actina luego de la infección de las partículas virales de Rac1 Constitutiva activa y Rac1 dominante negativa (DN) en NA core**

Los animales seleccionados al azar fueron microinyectados en NA core con el lentivirus que contiene la mutante Rac1 constitutiva activa (LV-Rac CA), o con el lentivirus que contiene la mutante Rac1 dominante negativa (LV-Rac DN) o con el lentivirus no codificante (LV-Ctrl). Luego de transcurridos 5, 10, 15 días de expresión de los lentivirus fueron recolectadas muestras de tejido de NA, preferentemente core, y se determinaron los niveles de expresión de las proteínas Rac total, cofilina total, p-cofilina total y actina mediante inmunotransferencia para cada grupo experimental.



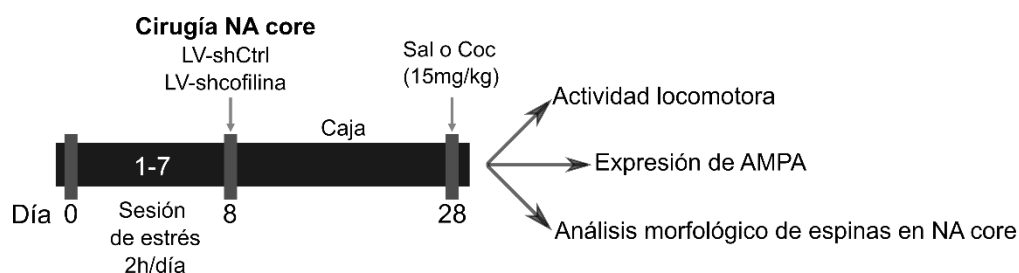
**Figura 11.** Modelo experimental para la determinación del curso temporal de niveles de expresión de las proteínas Rac, Cofilina, p-cofilina y Actina luego de la infección de las partículas virales de Rac1 Constitutiva activa y Rac1 dominante negativa (DN) en NA core.

### **Diseño experimental B: Análisis conductuales, bioquímicos y morfológicos**

### Determinación de la sensibilización conductual a cocaína, expresión de receptores AMPA de superficie en NA core y el análisis morfológico de espinas dendríticas de las MSNs luego de la microinyección de LV-shcofilina en NA core

Un día después de la última exposición a estrés, los animales estresados (E) y no estresados (NE) fueron anestesiados y mediante cirugía estereotáxica, fueron microinyectados en NA core con las partículas virales que contienen el RNA de interferencia de cofilina (LV-shcofilina) o su respectivo control (LV-shCtrl). Tres semanas después de la última exposición a estrés (día 28) fue monitoreada la actividad locomotora de los animales en respuesta a una inyección aguda de solución salina y cocaína (15 mg/kg i.p.) en cajas diseñadas para tal fin y 24 h después fueron recolectadas las muestras de tejido de NA core para los análisis morfológicos de segmentos dendríticos mediante microscopía confocal.

En experimentos separados, los animales E y NE, microinyectados en NA core con los lentivirus LV-shcofilina y LV-shCtrl, recibieron una inyección aguda de solución salina o cocaína (15mg/kg i.p.) y fueron sacrificados 45 min después. Las muestras de NA core bilaterales fueron recolectadas para la posterior determinación de la expresión de superficie de GluR1, mediante biotilación e inmunotransferencia.



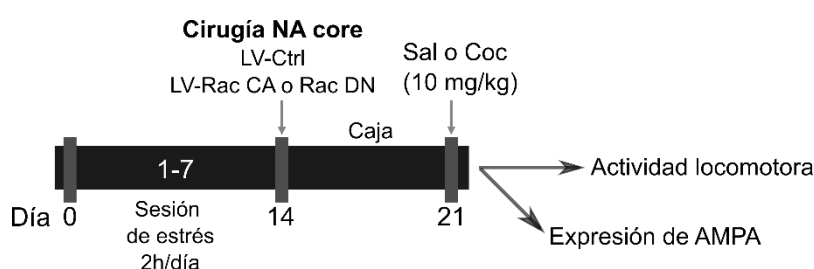
**Figura 12.** Modelo experimental para la determinación de la sensibilización conductual a cocaína, expresión de receptores AMPA de superficie en NA core y análisis morfológico de espinas dendríticas de las MSNs luego de la microinyección de LV-shcofilina en NA core.

### Determinación de la sensibilización conductual a cocaína y la expresión de receptores AMPA de superficie en NA core luego de la microinyección de LV-Rac CA y LV-DN en NA core

Los grupos E y NE fueron microinyectados en el NA core con las partículas virales que contienen las secuencias mutantes de Rac1 (LV-Rac CA o LV-Rac DN) o su respectivo control (LV-Ctrl). Dos semanas después de la última exposición a estrés (día

21) fue monitoreada la actividad locomotora de los animales en respuesta a una inyección aguda de solución salina y cocaína (10 mg/kg i.p.) en un actógrafo.

En experimentos separados, los animales E y NE microinyectados en el NA core con LV-Rac CA y LV-Ctrl, el día 21 recibieron una inyección aguda de solución salina o cocaína (15mg/kg i.p.) y fueron sacrificados 45 min después. Las muestras bilaterales de NA core fueron recolectadas para la determinación de la expresión de receptores de superficie AMPA subunidad GluR1 mediante los protocolos descritos anteriormente de biotilación y inmunotransferencia.

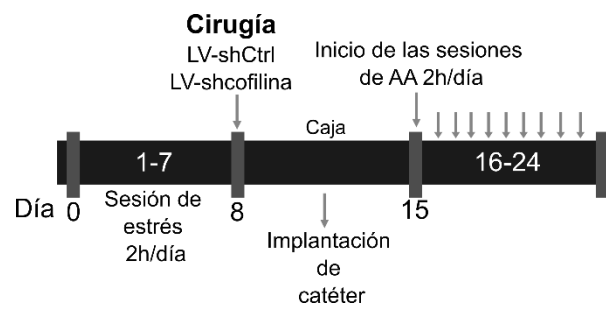


**Figura 13.** Modelo experimental para la determinación de la sensibilización conductual a cocaína y expresión de receptores AMPA de superficie en NA core luego de la microinyección de LV-Rac CA y LV-DN en NA core.

### **Diseño experimental C: Adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína y sacarosa oral**

El día 8 del esquema experimental los animales E y NE fueron microinyectados en NA core con las partículas virales que contienen el RNA de interferencia de cofilina (LV-shcofilina) o su respectivo control (LV-shCtrl). Una semana después (día 14), fueron realizadas las cirugías de implantación de catéteres (adquisición de la conducta de AA de cocaína) y al día 21 del esquema experimental los animales comenzaron con sesiones diarias de 2 h de AA durante 10 días consecutivos. En experimentos separados, la adquisición de la conducta de AA de sacarosa oral, inicio una semana después de las

microinyecciones intracraneales de los lentivirus (día 14), con sesiones diarias de 1 h durante 10 días consecutivos.



**Figura 14.** Modelo experimental de la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína o sacarosa oral.

# RESULTADOS

---

## 1. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA COFILINA EN LA VULNERABILIDAD AL CONSUMO DE COCAÍNA INDUCIDA POR ESTRÉS

### 1.1 Curso temporal de los niveles de expresión de las proteínas cofilina, p-cofilina, radio de p-cofilina/cofilina y actina luego de la infección con las partículas virales del RNA de interferencia de cofilina en NA core

Con el objetivo de caracterizar el rol de la proteína cofilina en la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducido por estrés en NA core, utilizamos como herramienta molecular un lentivirus (LV) que contiene un shRNA de interferencia denominado LV-shcofilina, específico contra la secuencia de la proteína de rata, para inhibir la expresión de cofilina en NA core, mediante la microinyección por cirugía estereotáxica de acuerdo con las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (Paxinos G & Watson C., 2007). Luego de transcurridos 10, 15, y 20 días de expresión del lentivirus, los animales son sacrificados y se toman muestras de tejido de NA (preferentemente core) (**Figura 15A**). Utilizando la técnica de Western blot determinamos la expresión de las proteínas cofilina total (cofilina), p-cofilina (forma inactiva), actina (actina) y el radio de p-cofilina respecto de cofilina total (p-cofilina/cofilina). En la **Figura 15B** mostramos una imagen representativa del sitio de infección en NA core (delimitado con línea punteada) luego de realizar una tinción utilizando azul de cresil violeta. En esta imagen se puede observar tanto la caída de la cánula como la correspondiente inyección de lentivirus. La **Figura 15C** representa el sitio de infección con el lentivirus a lo largo del eje antero-posterior. Las **Figuras 15D** (a, b y c) muestran imágenes confocales de células que expresan GFP (en inglés “*green fluorescein protein*”) infectadas con el lentivirus de RNA de interferencia de cofilina, inmunomarcadas con un anticuerpo anti-GFP y los núcleos coloreados con DAPI en azul. La **Figura 15E** es una representación de las corridas electroforéticas de Western blot para cada proteína utilizada para cuantificar los niveles de proteínas. Las **Figuras 15F-I** muestran la cuantificación de los niveles de cofilina total (**Figura 15F**), p-cofilina (**Figura 15G**), radio p-cofilina/cofilina (**Figura 15H**) y actina (**Figura 15I**).

El análisis del curso temporal de los niveles de expresión de cofilina, luego de la microinyección en NA core con el lentivirus de RNA de interferencia específico para inhibir su expresión (LV-shcofilina), muestra una disminución en los niveles totales de expresión de cofilina en los tiempos post-infección medidos (**Figura 15F**; Análisis de

varianza (ANOVA) de una vía, Tratamiento,  $F_{(3-16)} = 12.39$   $p = 0,0002$ ). Específicamente, el análisis posterior utilizando el test de Bonferroni indica que los niveles de cofilina total se encuentran disminuidos luego de 10, 15 y 20 días post infección con el lentivirus de RNA de interferencia de cofilina, respecto de los niveles de proteína observados en animales infectados con el lentivirus control (LV-shCtrl), los cuales son considerados como niveles de referencia basales para todas las determinaciones (Bonferroni, Día 10 vs Ctrl  $^{\#}p < 0.05$  y Día 15, 20 vs Ctrl  $^*p < 0.05$ ). La determinación de los niveles de expresión de la proteína p-cofilina (forma inactiva) revela que no se producen variaciones significativas en la expresión de la proteína a lo largo del curso temporal (**Figura 15G**; ANOVA de una vía, Tratamiento,  $F_{(3-14)} = 1.218$   $p = 0.3397$ ). Sin embargo, la determinación indirecta de la actividad de la proteína cofilina reflejada en el análisis del ratio de p-cofilina respecto de cofilina total (p-cofilina/cofilina) (**Figura 15H**; ANOVA de una vía, Tratamiento  $F_{(3-16)} = 4.534$   $p = 0.0175$ ), muestra un incremento de la relación p-cofilina/cofilina luego de 15 y 20 días de la infección con el RNA de interferencia de cofilina comparado con su respectivo control (Bonferroni,  $^*p < 0.05$ ) en NA core.

Por último, el análisis de los niveles de expresión de actina luego del tratamiento con LV-shcofilina revela que no se producen cambios en los niveles de expresión de la proteína actina durante todo el curso temporal, comparado con los niveles basales de proteína observados en los animales infectados con el lentivirus control (LV-shCtrl) (**Figura 15I**; ANOVA de una vía, Tratamiento,  $F_{(3-17)} = 2,813$   $p = 0,0705$ ).



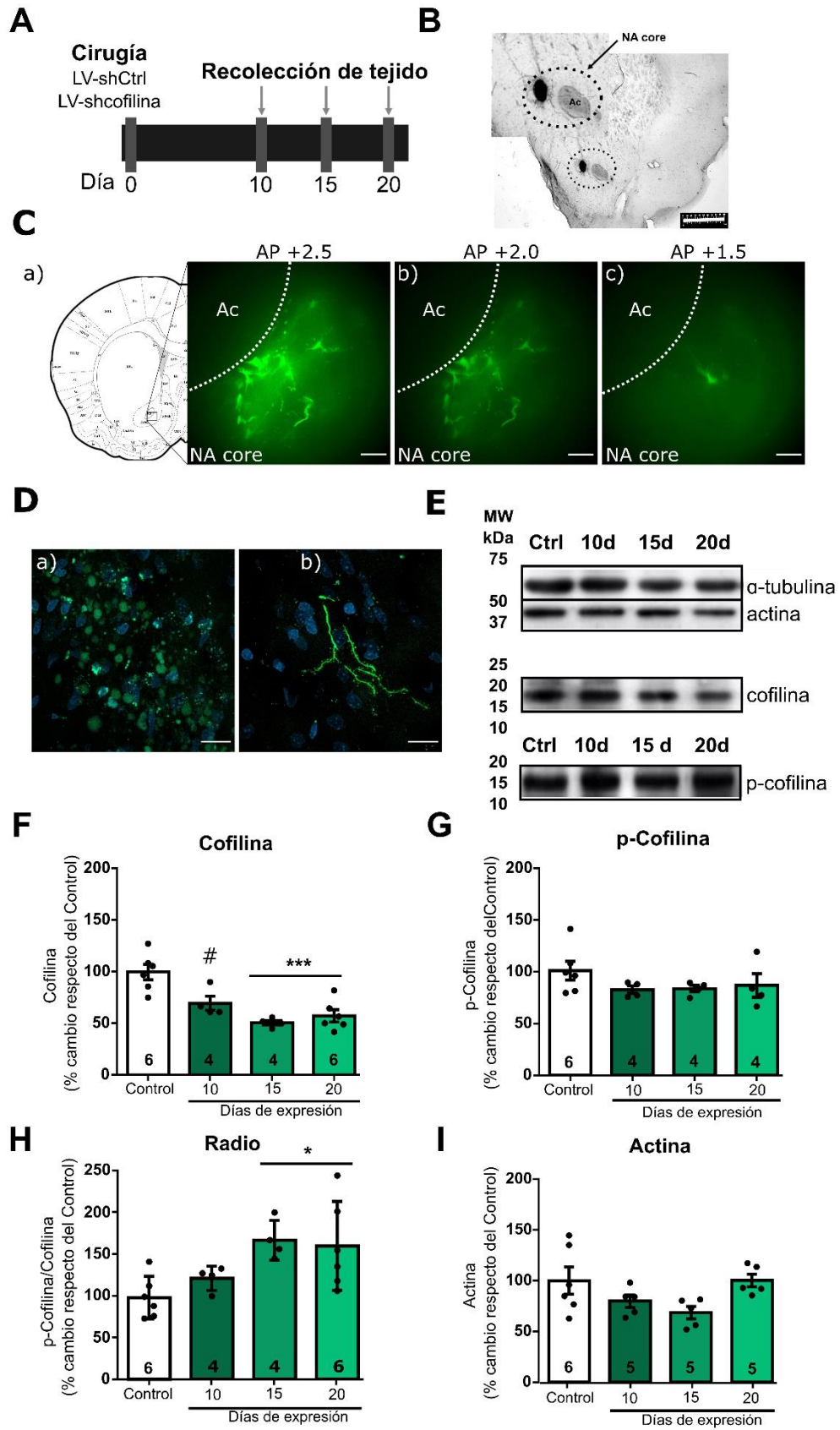
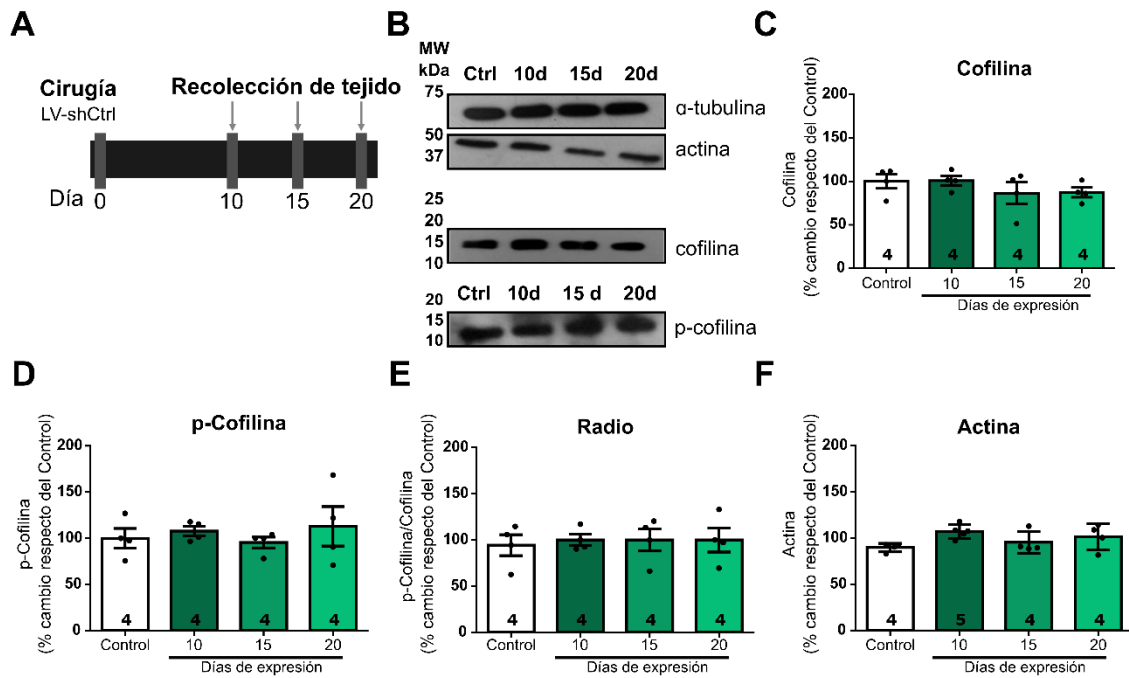


Figura 15. Curso temporal de los niveles de expresión de las proteínas cofilina, p-cofilina, radio p-cofilina/cofilina y actina luego de la infección en NA core con LV-shcofilina. Los datos representan la

media  $\pm$  SEM del número de mediciones realizadas para cada gráfico. Los datos fueron analizados mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguido del Test de Bonferroni. **A)** Diseño experimental. **B)** Imagen representativa de un sitio de infección con las partículas virales de LV shcofilina, teñido con azul de cresil violeta (2.5x). La línea punteada delimita el área de NA core infectada. **C)** (a, b, c) Imágenes representativas de cortes coronales de NA core infectados con el LV-shcofilina a lo largo del eje anterior-posterior. **D)** Imágenes confocales de la inmunofluorescencia de NA core, utilizando un anticuerpo anti-GFP que se une específicamente a las células infectadas con el lentivirus de RNA de interferencia de cofilina (60x). **E)** Imágenes representativas de las corridas de Western blot para cada proteína medida. En todas las cuantificaciones se utiliza el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina como control de carga. **F)** Niveles de expresión de cofilina en NA core. **G)** Niveles de expresión de p-cofilina en NA core. **H)** Radio de p-cofilina/cofilina total en NA core. **I)** Niveles de expresión de actina en NA core.

Como mencionamos previamente, las determinaciones obtenidas de los animales microinyectados en NA core con el lentivirus control (LV-shCtrl) son considerados valores de referencia en las determinaciones realizadas luego de la microinyección en NA core con el RNA de interferencia de cofilina. Asimismo, para descartar cambios en los niveles de expresión de cofilina total, p-cofilina y actina inducidos por el lentivirus control, se determinaron los niveles expresión de cada proteína luego de 10, 15, y 20 días de expresión del LV-shCtrl en NA core (**Figura 16A**). La **Figura 16B** es una representación de las corridas de Western blot para cada proteína utilizada para las cuantificaciones. Las **Figuras 16C-F** representan las mediciones de los niveles totales de expresión de cofilina total (**Figura 16C**), p-cofilina (**Figura 16D**), radio p-cofilina/cofilina total (**Figura 16E**) y actina total (**Figura 16F**).

Estos resultados demuestran que no se producen modificaciones en los niveles de expresión de cofilina (**Figura 16C**; ANOVA de una vía, Tratamiento,  $F_{(3-12)} = 0.9261$ ,  $p = 0.4579$ ), p-cofilina (**Figura 16D**, ANOVA de una vía, Tratamiento,  $F_{(3-12)} = 0.3905$ ,  $p = 0.7620$ ), radio p-cofilina/cofilina (**Figura 16E**, ANOVA de una vía, Tratamiento,  $F_{(3-12)} = 0,06601$ ,  $p = 0,9769$ ) y actina (**Figura 16F**, ANOVA de una vía, Tratamiento,  $F_{(3-13)} = 2,487$ ,  $p = 0,1065$ ) a lo largo del curso temporal luego de la infección con LV-shCtrl, respecto de los niveles de expresión de proteínas de animales control naive (sin tratamiento).



**Figura 16. Curso temporal de los niveles totales de expresión de las proteínas cofilina, p-cofilina, radio p-cofilina/cofilina y actina post infección intra-NA core con LV-shCtrl.** Los datos representan la media  $\pm$  SEM del número de mediciones realizadas para cada gráfico. Los datos fueron analizados mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguido del Test de Bonferroni. **A)** Diseño experimental. **B)** Imágenes representativas de las corridas de Western Blot para cada proteína medida. En todas las cuantificaciones se utiliza el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina como control de carga. **C)** Niveles de expresión de cofilina en NA core. **D)** Niveles de expresión de p-cofilina en NA core. **E)** Radio de p-cofilina/cofilina total en NA core. **F)** Niveles de expresión de actina en NA core.

*Conclusión parcial del resultado:*

Estos resultados revelan que las partículas lentivirales del RNA de interferencia de cofilina microinyectadas *in vivo* en NA core son eficientes para realizar el silenciamiento génico de la proteína cofilina, ya que provocan una reducción de sus niveles de expresión de aproximadamente el 50% respecto de los niveles basales. La eficiencia en el tratamiento génico se refleja en la disminución en los niveles totales de expresión de la proteína cofilina luego de transcurridos 10 días de su infección en NA core, cuya disminución se mantiene durante los tiempos experimentales seleccionados para los experimentos. Por otra parte, considerando que cofilina es una proteína cuya actividad está regulada por fosforilación, un indicador indirecto de la actividad depolimerizante de la proteína cofilina es la determinación del radio de p-cofilina respecto de cofilina total. En este sentido, los resultados obtenidos evidencian que el tratamiento

---

con LV-shcofilina en NA core luego de transcurridos 15 y 20 días desde el momento de la infección promueve la estabilización del citoesqueleto de actina.

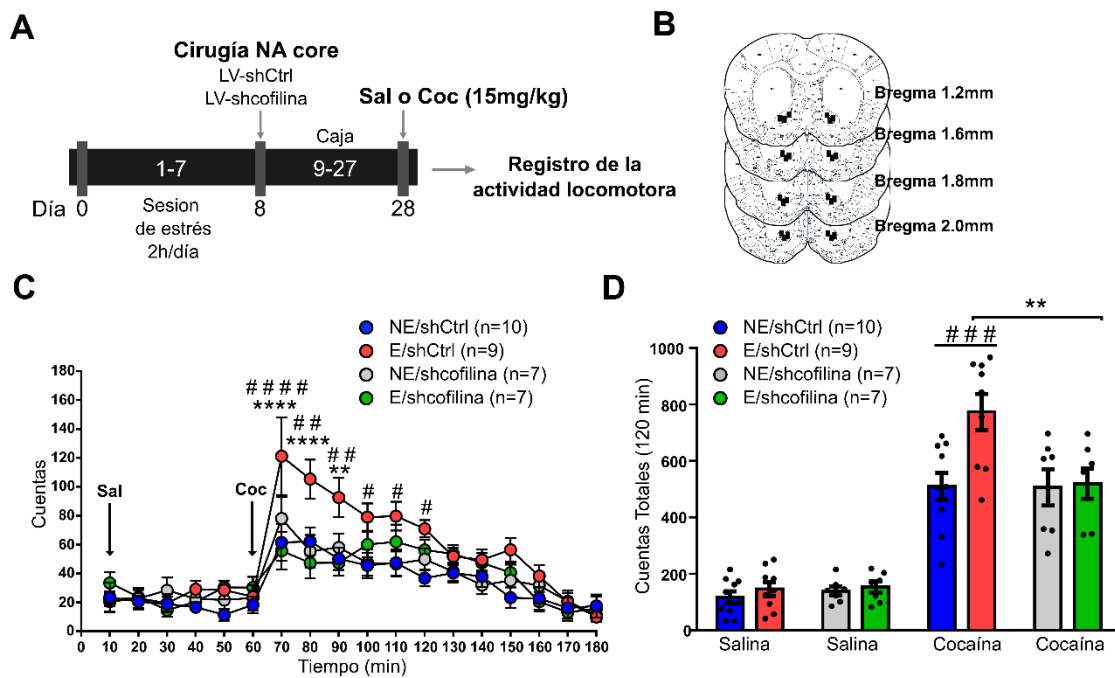
## **1.2 La inhibición de la expresión de cofilina en NA core previene la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés**

Estudios previos de nuestro laboratorio, demuestran que la exposición a estrés agudo o crónico induce sensibilización locomotora en respuesta a una inyección aguda de cocaína (15 mg/kg i.p.) (Esparza et al., 2012; Garcia-Keller et al., 2013) o anfetamina (Pacchioni et al., 2007). En este sentido, Esparza y col (Esparza et al., 2012) reportaron que la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés está acompañada del remodelado del citoesqueleto de actina en NA core, e involucra variaciones en la expresión de proteínas asociadas con la regulación de la dinámica de actina, como p-cofilina y p-cortactina (Esparza et al., 2012).

En el presente trabajo evaluamos la participación de cofilina en la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés, en animales estresados crónicamente y no estresados, y microinyectados en NA core con las partículas virales del RNA de interferencia de cofilina (shcofilina) o su respectivo lentivirus control (shCtrl), luego de una inyección aguda de solución salina i.p (Sal) o cocaína 15mg/kg i.p. (Coc) (**Figura 17A**). La **Figura 17B** representa los sitios de microinyección de los lentivirus en NA core (señalados con puntos negros) obtenidos según el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos G & Watson C., 2007). Las **Figuras 17C y D** representan las mediciones de actividad locomotora obtenidas para cada grupo experimental luego de una inyección aguda de solución salina o cocaína i.p.

El registro de la actividad locomotora, expresada como el número de cuentas en función del tiempo (**Figura 17C**), muestra que la expresión conductual de la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína es inhibida por la microinyección en NA core del RNA de interferencia de cofilina. Asimismo, estos registros revelan que la disminución de los niveles de expresión de cofilina en NA core no inducen alteraciones en la actividad locomotora en los animales no estresados luego de la inyección de salina y cocaína (**Figura 17C**; ANOVA de muestras repetidas (MR) de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shCtrl/LV-shcofilina): Tiempo,  $F_{(17-493)} = 22.75$ ,  $p < 0.0001$ ; no-estrés/estrés,  $F_{(3-29)} = 7.326$ ,  $p = 0.0008$ ; Interacción,  $F_{(51-493)} = 1.719$ ,  $p = 0.0022$ ). El posterior test de Bonferroni indica un incremento significativo en la actividad locomotora del grupo

estrés/shCtrl entre los 70 y 150 minutos del experimento respecto del grupo no-estrés/shCtrl ( $^{\#}p < 0.05$ , entre los 70 y 150 minutos). Asimismo, el registro de actividad locomotora del grupo estrés/shCtrl es significativamente diferente entre los 70 y 90 minutos respecto del grupo estrés/shcofilina, así como también, del grupo no estresado (no-estrés/shCtrl y no-estrés/shcofilina) ( $^*p < 0.05$ , entre los 70 y 90 minutos). Por otra parte, el test de Bonferroni indica que no se producen diferencias en la respuesta conductual luego de una inyección aguda de solución salina entre los diferentes grupos experimentales ( $p > 0.05$ , entre los 0 y 60 minutos). Además, la representación de la actividad locomotora expresada como el número de cuentas totales durante 120 minutos luego de la inyección de salina y cocaína (**Figura 17D**), refleja el incremento en la actividad locomotora del grupo estrés/shCtrl en respuesta a la inyección aguda de cocaína con respecto al resto de los grupos (estrés y no-estrés tratados con shcofilina y no-estrés tratado con shCtrl) (**Figura 17D**; ANOVA de MR de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shcofilina salina o cocaína/LV-shCtrl salina o cocaína): Tratamiento  $F_{(3-58)} = 74.21$ ,  $p < 0.0001$ ; no-estrés/estrés  $F_{(1-58)} = 6.621$   $p = 0.0127$ ; Interacción  $F_{(3-58)} = 4.352$   $p = 0.0078$ ). El test de Bonferroni posterior indica que hay diferencias significativas en las cuentas totales entre el grupo estrés/LV-shCtrl y el resto de los grupos durante los 120 minutos siguientes a la inyección de cocaína ( $^{\#}p < 0.05$ , respecto de no-estrés/shCtrl,  $^*p < 0.05$ , respecto de no-estrés y estrés tratado con shcofilina).



**Figura 17. Registro de la actividad locomotora.** Actividad locomotora luego de cocaína (15 mg/kg i.p.) en ratas microinyectadas en NA core con LV-shCtrl (1ul/lado) o LV-shcofilina (1ul/lado), medido tres semanas después del estrés repetido. Después de una media hora de habituación en las cajas de testeo, los animales No estrés/shCtrl (n=10), Estrés/shCtrl (n=9), No estrés/shcofilina (n=7) y Estrés/shcofilina (n=7) recibieron una inyección i.p. de solución salina y fueron testeados durante una hora, seguido de una inyección i.p. de cocaína y fueron monitoreados durante dos horas (120 min). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de las cuentas obtenidas en intervalos de 10 min. **A)** Diseño experimental. **B)** Secciones representativas del cerebro de rata en las cuales se muestran los sitios de microinyección de lentivirus en NA core denotadas con puntos negros. **C)** Cuentas cada 10 minutos de la actividad locomotora en función del tiempo. La flecha indica la inyección de salina y cocaína i.p 15 mg/kg. \* $p < 0.05$  comparado con el resto de los grupos (No estrés/shCtrl No estrés/shcofilina y Estrés/shcofilina), # $p < 0.05$  comparado con No estrés/shCtrl. **D)** Cuentas totales 120 min después de la inyección de salina y cocaína. \* $p < 0.05$  comparado con el resto de los grupos. # $p < 0.05$  comparado con el grupo No estrés/shCtrl.

#### *Conclusión parcial del resultado:*

Estos resultados demuestran la participación de la proteína cofilina en la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por la exposición a estrés, ya que la inhibición de cofilina en NA core mediante la microinyección del RNA de interferencia de cofilina, previene la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés crónico.

### **1.3 Cofilina modula los cambios plásticos estructurales en las espinas dendríticas del NA core en respuesta a cocaína en animales previamente estresados**

#### *a. Participación de cofilina en los cambios asociados con la densidad de espinas dendríticas en NA core en animales estresados luego de la cocaína*

La plasticidad dependiente de la experiencia asociada al consumo de psicoestimulantes es mediada por la reorganización de áreas neuronales comprendidas en el circuito de la motivación (Robinson & Kolb, 2004). En este sentido, el NA core ha sido sugerido como el *locus* de las adaptaciones a largo plazo inducidas por el consumo de drogas (Di Chiara, 2002; Ito et al., 2004; Meredith et al., 2008).

Tanto la administración de cocaína, así como también la exposición a situaciones estresantes pueden alterar la dinámica de actina en NA (Dietz et al., 2012; S. A. and Golden & Russo, 2012; H. Shen et al., 2009; Toda et al., 2006, 2010), aumentando la densidad de espinas y la reorganización dendrítica (T. E. Brown et al., 2011; Christoffel, Golden, Dumitriu, et al., 2011; Dietz et al., 2012; Dumitriu et al., 2012; Khibnik et al.,

---

2016; Robinson & Kolb, 2004), cambios íntimamente asociados al fenómeno de sensibilización conductual a psicoestimulantes (Robinson & Kolb, 2004).

Las espinas dendríticas pueden clasificarse en *mushroom*, *thin* y *stubby*. Brevemente, las espinas *stubby* son estructuras plásticas inmaduras caracterizadas por presentar una longitud total similar a la del diámetro de su cabeza y escasa presencia de cuello (Schmidt & Eilers, 2009). Las espinas tipo *thin* poseen una longitud total mayor que el ancho de su cabeza, y este a su vez, es mayor que el ancho de su cuello. Se consideran estructuras inmaduras y plásticas. Las espinas tipo *mushroom* presentan un ancho de cabeza mayor a la de su cuello y se caracterizan por ser estructuras estables, maduras y poco plásticas, que expresan una mayor cantidad de receptores AMPA a lo largo de la PSD, comparadas con las espinas del tipo *stubby* (S. A. and Golden & Russo, 2012). Además de las diferencias morfológicas, los diferentes tipos de espinas difieren en sus propiedades fisiológicas, así, cambios en la morfología de las espinas asociados al remodelado de actina, pueden conducir a alteraciones en la fuerza sináptica (Harris 1994). De esta manera, la caracterización de las espinas dendríticas según su morfología, refleja con mayor precisión la relevancia de los cambios en la plasticidad dependiente de la experiencia (S. A. and Golden & Russo, 2012).

En el presente trabajo evaluamos los cambios en la densidad de espinas dendríticas mediados por cofilina, en animales estresados y no estresados, microinyectados en NA core con los lentivirus control (LV-shCtrl) y el RNA de interferencia de cofilina (LV-shcofilina), 24 h después de una inyección aguda de solución salina (Sal) o cocaína (Coc, 15 mg/kg) (según lo descrito en el modelo experimental de la **Figura 17A**). Los grupos de animales analizados durante este experimento son los siguientes: NE/shCtrl-Sal, NE/shCtrl-Coc, E/shCtrl-Sal, E/shCtrl-Coc, NE/shcofilina-Sal, NE/shcofilina-Coc, E/shcofilina-Sal y E/shcofilina-Coc. Las **Figuras 18A-B** representan las imágenes confocales utilizadas para la cuantificación de espinas dendríticas, de acuerdo a lo descrito previamente en Materiales y Métodos. El análisis estadístico de la densidad de espinas dendríticas se realiza con el software Rstudio utilizando un modelo lineal mixto de tres factores (estrés, lentivirus y droga) (**Tabla 1**), seguido de un análisis de múltiples comparaciones para evidenciar diferencias entre pares (**Figuras 18C-F**).

La determinación de la densidad total de espinas dendríticas en NA core asociado a la cuantificación de los tres subtipos de espinas, revela que no se producen cambios

significativos entre las densidades de espinas totales entre los grupos de animales. Sin embargo, los cambios en la densidad total de espinas están asociados con los factores lentivirus y cocaína, no así con la exposición a estrés (**Tabla 1. Modelo lineal mixto:** cocaína  $F_{(1-145)} = 9.45$   $p = 0.003$ , lentivirus  $F_{(1-40)} = 10.80$   $p = 0.002$  y estrés  $F_{(1-40)} = 4.02$   $p = 0.052$ , estrés\*LV  $F_{(1-40)} = 1.55$   $p = 0.221$ , estrés\*cocaína  $F_{(1-145)} = 1.84$   $p = 0.178$ , lentivirus\*cocaína  $F_{(1-145)} = 0.83$   $p = 0.363$  y estrés\*LV\*cocaína  $F_{(1-145)} = 0.54$   $p = 0.464$ ). El análisis de la densidad de espinas tipo *mushroom* en el NA core revela una interacción significativa en este subtipo de espina (**Tabla 1. Modelo lineal mixto:** cocaína  $F_{(1-145)} = 3.36$ ,  $p = 0.069$ , lentivirus  $F_{(1-40)} = 11.77$   $p = 0.001$ , estrés  $F_{(1-40)} = 1.92$ ,  $p = 0.173$ , estrés\*lentivirus  $F_{(1-40)} = 3.97$   $p = 0.053$ , estrés\*cocaína  $F_{(1-145)} = 0.25$   $p = 0.615$ , lentivirus\*cocaína  $F_{(1-145)} = 1.21$   $p = 0.275$  y estrés\*lentivirus\*cocaína  $F_{(1-145)} = 5.97$   $p = 0.016$ ), sin cambios significativos entre los grupos de animales. La determinación de la densidad de espinas tipo *thin* en NA core, muestra una tendencia en aumento luego del tratamiento con shcofilina en animales estresados luego de la inyección de cocaína, y estos cambios son dependientes de los factores de estrés y cocaína (**Tabla 1. Modelo lineal mixto:** cocaína  $F_{(1-145)} = 5.24$   $p = 0.023$ , lentivirus  $F_{(1-40)} = 1.53$   $p = 0.223$ , estrés  $F_{(1-40)} = 9.67$   $p = 0.003$ , estrés\*LV  $F_{(1-40)} = 1.43$   $p = 0.239$ , estrés\*cocaína  $F_{(1-145)} = 2.51$   $p = 0.115$ , LV\*cocaína  $F_{(1-145)} = 0.10$   $p = 0.755$  y estrés\*LV\*cocaína  $F_{(1-145)} = 0.00$   $p = 0.988$ ). El análisis de la densidad de espinas *stubby* revela que no se producen cambios significativos entre los grupos (Tabla 1. Modelo lineal mixto: cocaína  $F_{(1-145)} = 0.59$   $p = 0.443$ , lentivirus  $F_{(1-40)} = 3.34$   $p = 0.071$ , estrés  $F_{(1-40)} = 0$   $p = 0.974$ , estrés\*LV  $F_{(1-40)} = 3.78$   $p = 0.059$ , estrés\*cocaína  $F_{(1-145)} = 1.75$   $p = 0.188$ , LV\*cocaína  $F_{(1-145)} = 0$   $p = 0.983$  y estrés\*LV\*cocaína  $F_{(1-145)} = 0.79$   $p = 0.377$ ).

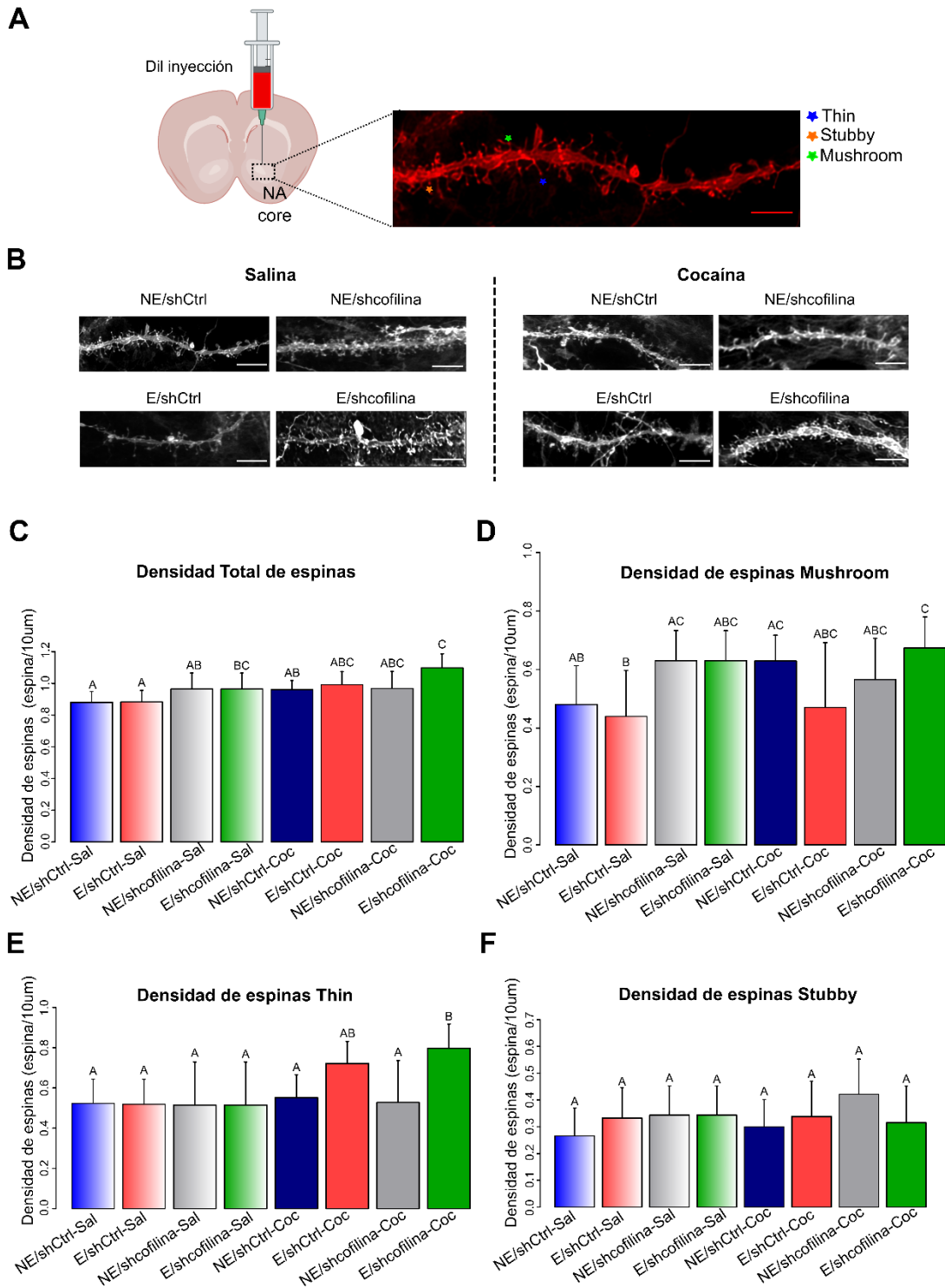


Densidad total de espinas				
Factores	Num DF	Den DF	F_Valor	P_Valor
Estrés	1	40	4.02	0.052
Lentivirus	1	40	10.8	0.002
Droga	1	145	9.45	0.003
Estrés*Lentivirus	1	40	1.55	0.221
Estrés*Droga	1	145	1.84	0.178
Lentivirus*Droga	1	145	0.83	0.364
Estrés*Lentivirus*Droga	1	145	0.54	0.464
Densidad de espinas Mushroom				
Factores	Num DF	Den DF	F_Valor	P_Valor
Estrés	1	40	1.92	0.173
Lentivirus	1	40	11.77	0.001
Droga	1	145	3.36	0.069
Estrés*Lentivirus	1	40	3.97	0.053
Estrés*Droga	1	145	0.25	0.615
Lentivirus*Droga	1	145	1.2	0.275
Estrés*Lentivirus*Droga	1	145	5.97	0.016
Densidad de espinas Thin				
Factores	Num DF	Den DF	F_Valor	P_Valor
Estrés	1	40	9.67	0.003
Lentivirus	1	40	1.53	0.223
Droga	1	145	5.24	0.023
Estrés*Lentivirus	1	40	1.43	0.239
Estrés*Droga	1	145	2.51	0.115
Lentivirus*Droga	1	145	0.1	0.755
Estrés*Lentivirus*Droga	1	145	0	0.988
Densidad de espinas Stubby				
Factores	Num DF	Den DF	F_Valor	P_Valor
Estrés	1	40	0	0.947
Lentivirus	1	40	3.43	0.071
Droga	1	145	0.59	0.443
Estrés*Lentivirus	1	40	3.78	0.059
Estrés*Droga	1	145	1.75	0.188
Lentivirus*Drug	1	145	0	0.983
Estrés*Lentivirus*Droga	1	145	0.79	0.377

Tabla 1. Análisis morfológico de espinas dendríticas en NA core por Rstudio utilizando un modelo lineal mixto de tres factores (estrés, lentivirus y droga).

El análisis de múltiples comparaciones para la densidad total de espinas dendríticas revela cambios significativos en las densidades totales de espinas de los siguientes pares de grupos de animales (**Figura 18C**): NE/shCtrl-Sal vs E/shcofilina-Coc ( $F_{(1-145)} = 23.59, p < 0.01$ ), NE/shCtrl-Coc vs E/shcofilina-Coc ( $F_{(1-145)} = 8.77, p = 0.03$ ), NE/shCtrl-Sal vs E/shcofilina-Sal ( $F_{(1-145)} = 7.44, p = 0.03$ ), NE/shcofilina-Sal vs E/shcofilina-Coc ( $F_{(1-145)} = 7.38, p = 0.03$ ), E/shCtrl-Sal vs E/shcofilina-Coc ( $F_{(1-145)} = 20.98, p < 0.01$ ) and E/shCtrl vs E/shcofilina-Sal ( $F_{(1-145)} = 6.52, p = 0.05$ ). Las múltiples

comparaciones para las espinas tipo *mushroom* muestran diferencias entre los siguientes grupos de animales (**Figura 18D**): NE/shCtrl-Sal vs E/shcofilina-Coc ( $F_{(1-145)} = 13.34$ ,  $p = 0.01$ ), NE/shCtrl-Coc vs E/shcofilina-Sal ( $F_{(1-145)} = 11.50$ ,  $p = 0.03$ ), NE/shcofilina-Sal vs E/shCtrl-Sal ( $F_{(1-145)} = 11.92$ ,  $p = 0.03$ ), y E/shCtrl-Sal vs E/shcofilina-Coc ( $F_{(1-145)} = 17.42$ ,  $p < 0.01$ ). Las múltiples comparaciones para las densidades de espinas tipo *thin* revelan diferencias entre los siguientes grupos de tratamientos (**Figura 18E**): NE/shCtrl-Sal vs E/shcofilina-Coc ( $F_{(1-145)} = 11.62$ ,  $p = 0.02$ ), NE/shCtrl-Coc vs E/shcofilina-Coc ( $F_{(1-145)} = 7.85$ ,  $p = 0.03$ ), NE/shcofilina-Coc vs E/shcofilina-Coc ( $F_{(1-145)} = 9.12$ ,  $p = 0.02$ ), NE/shcofilina-Sal vs E/shcofilina-Coc ( $F_{(1-145)} = 9.13$ ,  $p = 0.02$ ), y E/shCtrl-Sal vs E/shcofilina-Coc ( $F_{(1-145)} = 9.59$ ,  $p = 0.02$ ). Por último, las múltiples comparaciones para la densidad de espinas *stubby* revelan que no existen diferencias entre los grupos experimentales (**Figura 18F**).



**Figura 18. Densidad de espinas dendríticas en NA core.** **A)** Imagen representativa de una fotografía confocal de NA core, luego de la inyección del colorante Dil en un corte de tejido. **B)** Imágenes representativas de segmentos dendríticos de NA core tomadas con microscopio confocal de cada grupo experimental luego de una inyección de solución salina o cocaína. **C)** Densidad total de espinas. **D)** Densidad de espinas *mushroom*. **E)** Densidad de espinas *thin*. **F)** Densidad de espinas *stubby*.

b. *Participación de cofilina en los cambios asociados con diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas de NA core en respuesta a cocaína en animales estresados*

La sensibilización conductual inducida por cocaína, así como también, señales previamente apareadas con la administración no-contingente de la droga y la exposición a estresores promueven el desborde de glutamato en el NA core proveniente de la activación de aferentes corticales prelímbicas. El incremento en la liberación de glutamato en NA core ocurre en paralelo con la potenciación sináptica transiente (t-SP en inglés “*transient synaptic potentiation*”) de las MSNs de NA (Bobadilla et al., 2017; Garcia-Keller et al., 2016; Gipson, Kupchik, et al., 2013; Pierce et al., 1996). Este evento transitorio, puede medirse a través de la determinación de dos biomarcadores de potenciación sináptica en NA, como son: (i) el incremento en diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas de NA core y (ii) el incremento en el radio AMPA/NMDA, considerado como un indicador del incremento en la transmisión sináptica mediada por receptores AMPA (Bobadilla et al., 2017). Asimismo, el incremento en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas junto con el incremento en el radio AMPA/NMDA se ha correlacionado positivamente con la reinstalación de la búsqueda de cocaína en animales (Gipson, Kupchik, et al., 2013).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, evaluamos la influencia de cofilina en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas asociadas a la sensibilización conductual a cocaína inducida por la exposición a estrés, para lo cual realizamos curvas de frecuencia acumulada de los diámetros de las cabezas de las espinas dendríticas para cada grupo de animales, teniendo en cuenta las mismas condiciones experimentales que se detallan en el experimento presentado anteriormente (según el modelo experimental descrito en la **Figura 17A**). El análisis estadístico elegido para este experimento es el test de Kolmogorof-Smirnof (K-S).

Estos resultados revelan que la exposición a estrés crónico provoca una reducción en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas en animales microinyectados con shCtrl, 24 h después de la inyección de solución salina, comparado con los animales no estresados tratados con el lentivirus control (E/shCtrl-Sal vs NE/shCtrl-Sal, **Figura 19A**,  $p < 0.0004$ ). Dicho resultado se evidencia por el desplazamiento de la curva de frecuencia acumulada hacia la izquierda en los diámetros de las cabezas de espinas totales luego del estrés.

Al evaluar la influencia de cocaína en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas en animales microinyectados con shCtrl, los resultados muestran: (i) una reducción en el diámetro de las cabezas de las espinas totales inducido por cocaína en animales no estresados, respecto de animales no estresados luego de una inyección de solución salina (NE/shCtrl-Sal vs NE/shCtrl-Coc, **Figura 19C**,  $p < 0.0004$ ), mientras que por otra parte revelan: (ii) un incremento en el diámetro de las cabezas de las espinas totales en animales estresados, evidenciado por el desplazamiento hacia la derecha en la curva de frecuencia acumulada de los diámetro de las cabezas de espinas totales en aquellos animales estresados crónicamente, respecto de los animales no estresados (E/shCtrl-Coc vs NE/shCtrl-Coc, **Figura 19B**,  $p < 0.0252$ ). De manera parcial, estos resultados sugieren que en animales no estresados los cambios observados en los diámetros de las cabezas de las espinas de NA core, inducidos por una inyección no-contingente de cocaína luego de 24 h, son similares a las modificaciones originadas por la exposición previa a estrés crónico. Mientras que, en animales estresados crónicamente la administración de cocaína induce un incremento en los diámetros de las cabezas de las espinas dendríticas en NA core.

Al evaluar la influencia de la disminución de los niveles de expresión de cofilina, en animales no estresados microinyectados con shcofilina en NA core respecto de aquellos microinyectados con shCtrl, luego de una inyección de salina y cocaína los resultados revelan: (i) una reducción mediada por shcofilina en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas en animales no estresados luego de una inyección aguda de solución salina, respecto de los animales no estresados tratados con el lentivirus control (NE/shcofilina-Sal vs NE/shCtrl-Sal, **Figura 19C**,  $p < 0.0004$ ). Mientras que, luego de una inyección no-contingente de cocaína (NE/shcofilina-Coc vs NE/shCtrl-Coc), los resultados muestran: (ii) un desplazamiento hacia la derecha en la curva de frecuencia acumulada de los diámetros de las cabezas de las espinas totales en los animales microinyectados con shcofilina respecto de los shCtrl (NE/shcofilina-Coc vs NE/shCtrl-Coc, **Figura 19D**,  $p < 0.0004$ ).

Asimismo, al comparar los animales no estresados microinyectados con shcofilina luego de una inyección de cocaína y salina, los resultados muestran un desplazamiento hacia la derecha luego de la cocaína (NE/shcofilina-Sal vs NE/shcofilina-Coc, **Figura 19C**,  $p < 0.0004$ ). Este desplazamiento en la frecuencia acumulada inducido por la inyección de cocaína en los animales no estresados microinyectados en NA core con

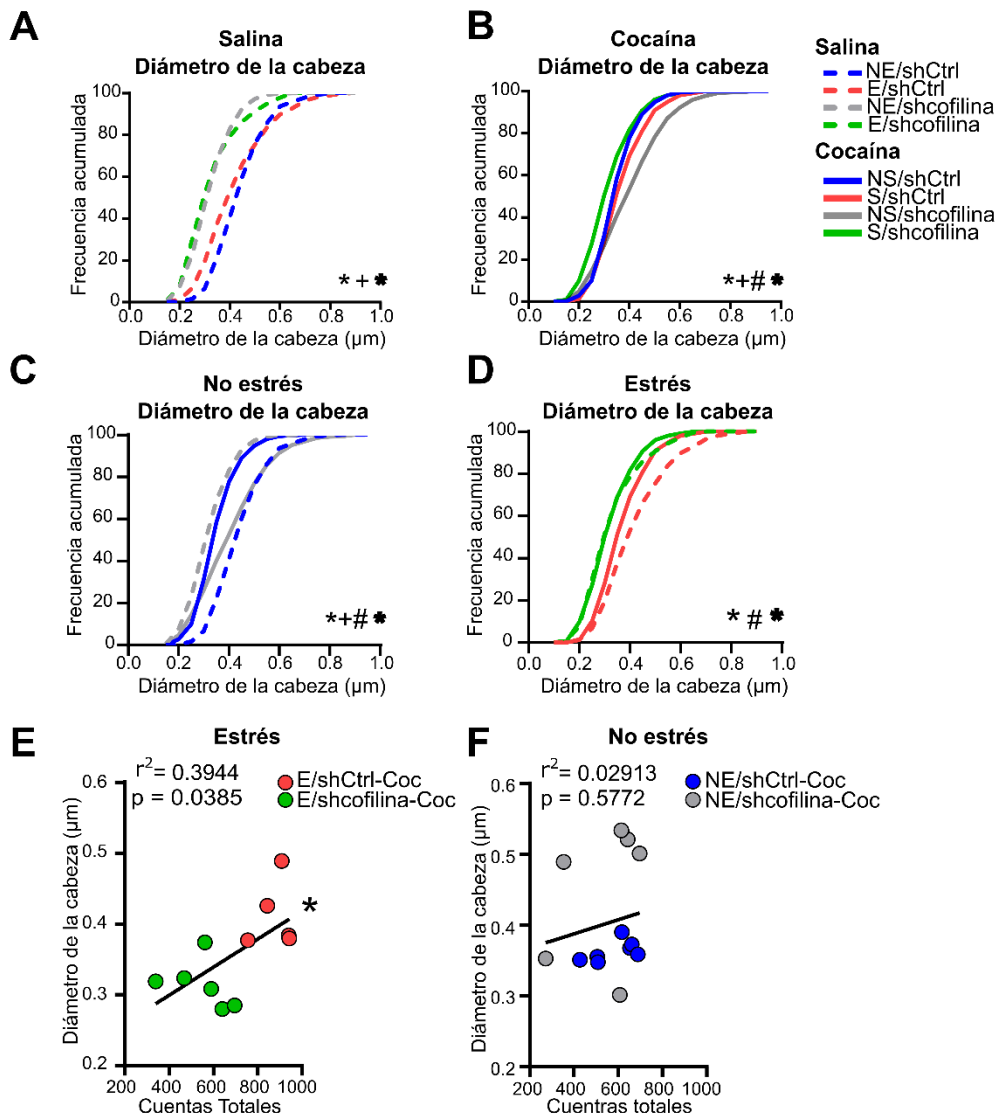
shcofilina (NE/shcofilina) se explica al graficar todos los grupos de animales no estresados luego de una inyección de salina y cocaína representados en la **Figura 19C**, en donde se observa que los animales NE/shcofilina luego de la cocaína alcanzan una curva de frecuencia acumulada similar a la de los animales no estresados microinyectados con shCtrl en NA core (NE/shCtrl), luego de la inyección de salina. Además, estos resultados explican, en parte, que la respuesta conductual de los animales no estresados microinyectados con shcofilina no se ve afectada luego de la inyección de cocaína durante los experimentos de sensibilización representados en las **Figura 17C-D**.

Por otra parte, al evaluar las curvas de frecuencia acumulada de los animales estresados y no estresados microinyectados con shcofilina luego de una inyección de cocaína o salina, los resultados revelan que no existen diferencias entre las curvas de frecuencia acumulada entre los grupos estresados y no estresados luego de una inyección de salina (E/shcofilina-Sal vs NE/shcofilina-Sal, **Figura 19A**,  $p = 0.096$ ).

La mayor relevancia de estos hallazgos se presenta al comparar las curvas de frecuencia acumulada de los animales sensibilizados microinyectados con shCtrl (E/shCtrl) respecto de aquellos animales estresados y microinyectados en NA core con shcofilina (E/shcofilina) luego de una inyección de cocaína o salina. Estos resultados revelan: (i) una reducción en los diámetros de las cabezas de las espinas totales en los animales estresados crónicamente microinyectados con el shcofilina en NA core luego de la inyección de solución salina (E/shCtrl-Sal vs E/shcofilina-Sal, **Figura 19C**,  $p < 0.0004$ ), mientras que, al comparar los grupos de animales luego de la inyección no-contingente de cocaína (E/shCtrl-Coc vs E/shcofilina-Coc) los datos muestran (ii) un desplazamiento a la derecha en la curva de frecuencia acumulada de los animales estresados microinyectados con shCtrl respecto de los animales estresados microinyectados con shcofilina, lo cual indica un incremento en los diámetros de las cabezas de las espinas totales inducido por cocaína solo en ratas estresadas tratadas con shCtrl (E/shCtrl-Coc vs E/shcofilina-Coc, **Figura 19D**,  $p < 0.0004$ ), mientras que este efecto es prevenido en ratas estresadas con niveles reducidos de cofilina en NA core.

Como se mencionamos anteriormente, la expansión de las cabezas de las espinas dendríticas en las MSNs de NA core es uno de los cambios plásticos descriptos que acompañan no solo la sensibilización conductual a cocaína, sino también la reinstalación de la búsqueda de droga en animales, íntimamente asociado a cambios en la plasticidad sináptica y a la inducción de la t-SP (Bobadilla et al., 2017). En este trabajo establecimos

una correlación positiva entre la disminución de la respuesta conductual a cocaína y la reducción en el diámetro de las cabezas de las espinas observado en animales estresados, destacando la relevancia funcional de los cambios en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas en la respuesta conductual inducida por los bajos niveles de expresión de cofilina en NA core en animales estresados crónicamente (**Figura 19E**  $r^2 = 0.3944$ ,  $p = 0.0385$ ). Por otra parte, los resultados no muestran una correlación entre los grupos de animales no estresados luego de la cocaína (**Figura 19H**  $r^2 = 0.02913$ ,  $p = 0.5772$ ).



**Figura 19. Efecto de la inhibición de cofilina en la estructura de las espinas dendríticas en NA core.** Gráficos de frecuencia acumulada de los diámetros de las cabezas de las espinas dendríticas de las MSNs. Los gráficos corresponden a los grupos de animales estresados y no estresados microinyectados con LV-shCtrl y LV-shcofilina, luego de 24 h de una inyección aguda de solución salina o cocaína. **A)** Plots de frecuencia acumulada del diámetro de la cabeza de las espinas totales luego de una inyección de solución

salina. \*NE/shCtrl vs E/shCtrl; <sup>+</sup>NE/shCtrl vs NE/shcofilina; \*E/shCtrl vs E/shcofilina. **B)** Plots de frecuencia acumulada del diámetro de la cabeza de las espinas totales luego de una inyección de cocaína 15mg/kg. \*NE/shCtrl vs E/shCtrl; <sup>+</sup>NE/shCtrl vs NE/shcofilina; <sup>#</sup>NE/shcofilina vs E/shcofilina; \*E/shCtrl vs E/shcofilina. **C)** Plots de frecuencia acumulada del diámetro de la cabeza de las espinas totales de todos los animales no estresados, microinyectados en NA core con LV-shCtrl y LV-shcofilina. \*NE/shCtrl-Sal vs NE/shCtrl-Coc; <sup>+</sup>NE/shcofilina-Sal vs NE/shcofilina-Coc; <sup>#</sup>NE/shCtrl-Sal vs NS/shcofilina-Sal y \*NE/shCtrl-Coc vs NE/shcofilina-Coc. **D)** Plots de frecuencia acumulada del diámetro de la cabeza de las espinas totales de todos los animales estresados, microinyectados en NA core con LV-shCtrl y LV-shcofilina. \*E/shCtrl-Sal vs E/shCtrl-Coc; <sup>+</sup>E/shcofilina-Sal vs E/shcofilina-Coc; <sup>#</sup>E/shCtrl-Sal vs E/shcofilina-Sal y \*E/shCtrl-Coc vs E/shcofilina-Coc. **E)** Correlación entre el diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas de las MSNs y las cuentas totales en animales estresados, n= 5-6 por grupo. **F)** Correlación entre el diámetro total de las cabezas de las espinas dendríticas de las MSNs y las cuentas totales en animales no estresados, n= 6-7 por grupo.

*Conclusión parcial del resultado:*

Las observaciones realizadas en este experimento indican que la exposición a estrés crónico induce modificaciones en las MSNs de NA, e involucra alteraciones en la estructura y/o morfología de las espinas dendríticas en respuesta a cocaína, que acompañan la expresión de la sensibilización conductual. Específicamente, la administración no-contingente de cocaína incrementa el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas en animales previamente expuestos a estrés. La mayor relevancia de estos resultados revela que la inhibición de cofilina en NA core reduce el tamaño de la cabeza de las espinas dendríticas y previene el incremento mediado por cocaína en animales estresados, cuyos cambios correlacionan positivamente con la prevención de la expresión de la sensibilización conductual.

**1.4 La inhibición de cofilina en NA core previene la expresión de receptores AMPA GluR1 de superficie en animales estresados crónicamente luego de una inyección aguda de cocaína**

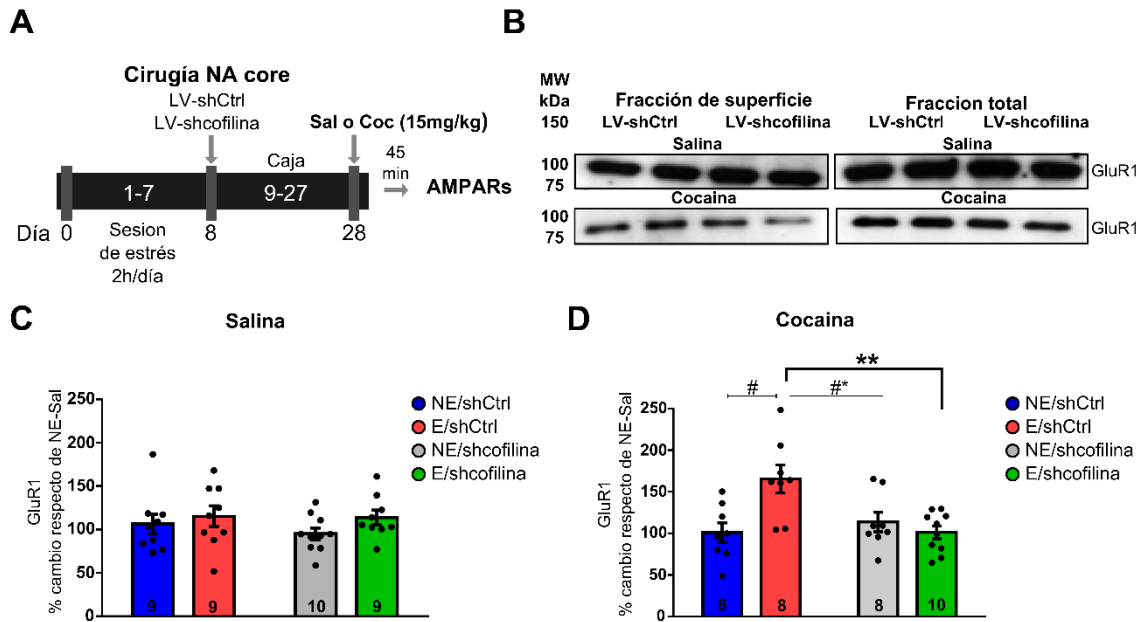
La regulación del tráfico de receptores glutamatérgicos de tipo AMPA es importante para numerosas formas de plasticidad sináptica. La ejecución motora de la búsqueda de cocaína depende de la activación de receptores AMPA en neuronas del NA, dado por aferentes glutamatérgicas que provienen de regiones corticales y límbicas (M.



E. Wolf, 2010; M. E. Wolf & Ferrario, 2010; M. E. Wolf & Tseng, 2012). Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés está acompañada por el incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie en la sinapsis excitatorias de NA (Esparza et al., 2012; Garcia-Keller et al., 2013).

En el presente estudio, evaluamos la participación de cofilina en la expresión de receptores AMPA de superficie en NA core en animales estresados crónicamente y no estresados microinyectados con el lentivirus control (LV-shCtrl) y el lentivirus con el RNA de interferencia de cofilina (LV-shcofilina), 45 min después de una inyección no contingente de cocaína de 15 mg/kg o solución salina (**Figura 20A**). Los grupos de animales analizados durante este experimento son los siguientes: NE/shCtrl-Sal, E/shCtrl-Sal, NE/shcofilina-Sal, E/shcofilina-Sal, NE/shCtrl-Coc, E/shCtrl-Coc, NE/shcofilina-Coc y E/shcofilina-Coc. En la **Figura 20B** se encuentran representadas las corridas electroforéticas de Western blot utilizando un anticuerpo anti-GluR1 y las **Figuras 20C-D** representan las cuantificaciones obtenidas para este experimento.

Estos resultados revelan un incremento en la expresión de receptores de tipo AMPA en superficie en respuesta a una inyección aguda de cocaína en los animales estresados crónicamente tratados con las partículas virales que expresan el lentivirus control (E/shCtrl) comparado con el resto de los grupos (NE/shCtrl, NE/shcofilina y E/shcofilina) (**Figura 20D**). Asimismo, los resultados muestran que el incremento en la expresión de receptores AMPA mediado por cocaína no ocurre en los animales estresados microinyectados con el RNA de interferencia de cofilina, comparado con los animales no estresados (**Figura 20D**, Análisis de varianza de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shcofilina cocaína/LV-shCtrl cocaína) revela efectos entre los grupos no-estrés vs estrés  $F_{(1-30)} = 4.643$ ,  $p = 0.0393$ , Interacción  $F_{(1-30)} = 10.17$ ,  $p = 0.0033$  y LV-shcofilina vs LV-shCtrl  $F_{(1-30)} = 4.528$   $p = 0.0417$ ). Por otra parte, la inyección aguda de solución salina i.p revela que no se producen cambios significativos en la expresión de receptores AMPA en superficie entre los grupos experimentales mencionados (**Figura 20C**, Análisis de varianza de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shcofilina salina/LV-shCtrl salina) revela que no hay diferencias significativas entre los grupos no-estrés vs estrés  $F_{(1-33)} = 2.020$ ,  $p = 0.1646$ , Interacción  $F_{(1-33)} = 0.2593$ ,  $p = 0.6140$  y LV-shcofilina vs LV-shCtrl  $F_{(1-33)} = 0.4025$   $p = 0.5302$ ).



**Figura 20. Efecto de la inhibición de cofilina en la expresión de receptores AMPA de superficie en animales estresados luego de la cocaína.** Expresión de receptores AMPA de superficie en animales estresados y no estresados, microinyectados con LV-shCtrl y LV-shcofilina, 45 min luego de una inyección aguda de solución salina i.p. o cocaína (15 mg/kg). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM del número de determinaciones. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías, seguido del Test de Bonferroni. **A)** Modelo experimental. **B)** Imágenes representativas de las corridas de western blot para GluR1. **C)** Expresión de receptores AMPA de superficie luego de 45 min de una inyección aguda de solución salina i.p. (n=10-9) **D)** Expresión de receptores AMPA de superficie luego de 45 minutos de una inyección aguda de cocaína 15 mg/kg i.p. (n=10-8). \* $p < 0.05$  comparado Estrés/LV-shcofilina. # $p < 0.05$  comparado con No estrés/LV-shCtrl. ## $p < 0.05$  comparado con No estrés/LV-shcofilina.

*Conclusión parcial del resultado:*

Estos resultados sugieren que las alteraciones en la dinámica de actina mediadas por cofilina en NA core influyen la reorganización en el tráfico de receptores AMPA inducida por cocaína, impidiendo el aumento en la expresión de receptores observado en animales previamente expuestos a estrés crónico que acompaña la expresión de la sensibilización conductual luego de una inyección aguda de cocaína.

### 1.5 Influencia de la inhibición de la expresión de cofilina en NA core durante la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína inducida por estrés

La exposición a estrés juega un papel crucial en la vulnerabilidad individual para desarrollar adicción (P. V. Piazza & Le Moal, 1996; Sinha, 2001). El incremento en la sensibilidad a las propiedades adictivas de las drogas mediada por estrés facilita no solo la adquisición de la AA de drogas, sino también el mantenimiento de la conducta y su recaída (Garcia-Keller et al., 2016; Garcia-Keller, Neuhof, et al., 2019; Sinha, 2007, 2009). Esta interacción facilitadora observada entre el estrés y la adicción llevó a sugerir la existencia de mecanismos moleculares en común que subyacen a la comorbilidad entre trastornos de estrés y la adicción (P. V. Piazza & Le Moal, 1996).

En el presente trabajo evaluamos el rol de cofilina en la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducido por estrés, utilizando un modelo de adquisición de la conducta de AA de cocaína, el cual nos brinda información con alta validez predictiva y de apariencia. Brevemente, de acuerdo al modelo experimental ejemplificado en la **Figura 21A**, un día después de la última exposición a estrés, todos los animales son microinyectados en NA core con el lentivirus shCtrl o shcofilina, y una semana después de su completa recuperación realizamos la implantación de los catéteres en la vena yugular derecha para las sesiones de AA. Las sesiones de adquisición de la conducta de AA comienzan 14 días después de la última exposición a estrés y se extienden por un periodo de 10 días consecutivos. Las **Figuras 21B, C y D** corresponden a los resultados obtenidos a lo largo del experimento.

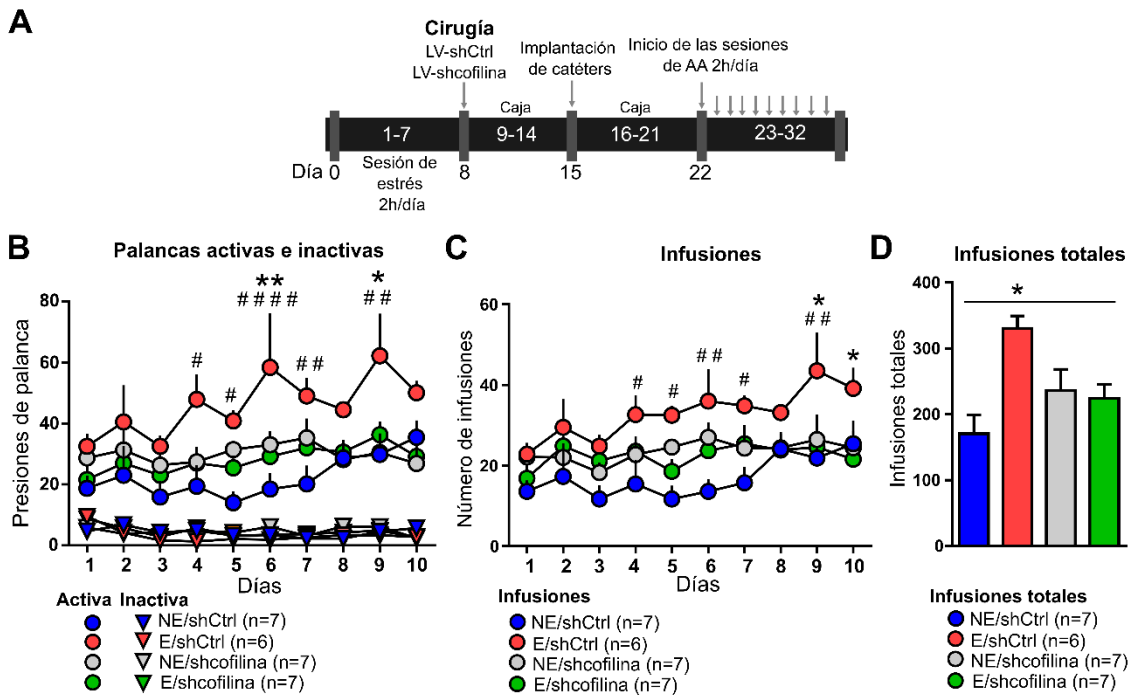
Estos resultados revelan un efecto facilitador del estrés crónico sobre la adquisición de la conducta de AA de cocaína en los animales estresados crónicamente y microinyectados en NA core con el lentivirus control (LV-shCtrl) comparado con el resto de los grupos. Estos hallazgos se evidencian al graficar el promedio del número de presiones en la palanca activa en función de los días (**Figura 21B**, ANOVA de MR de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shcofilina/LV-shCtrl): Interacción  $F_{(27-207)} = 0,8880$   $p = 0,6288$ , no-estrés/estrés  $F_{(3-23)} = 7,592$   $p = 0,0011$  y Tiempo  $F_{(9-207)} = 3,09705$   $p = 0,0016$ ) así como también en el promedio del número de infusiones de cocaína que alcanzan los animales, por día a lo largo de los esquema de adquisición (**Figura 21C**, ANOVA de MR de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shcofilina/LV-shCtrl): Interacción  $F_{(27-207)} = 0,6837$   $p = 0,8796$ , no-estrés/estrés  $F_{(3-23)} = 6,118$   $p = 0,0032$  y Tiempo  $F_{(9-207)} = 3,235$   $p = 0,0011$ ).

El posterior test de Bonferroni determina un incremento en el número de presiones en la palanca activa durante los días 4 a 9 del esquema de adquisición, para el grupo estresado y microinyectado con el shCtrl (E/shCtrl) comparado con el grupo que no fue expuesto a estrés (NE/shCtrl) y respecto del resto de los grupos (**Figura 21B**). Dichas diferencias se evidencian también en el número de infusiones de cocaína que alcanza el grupo estresado respecto del no estresado, microinyectados con el shCtrl durante el mismo periodo de tiempo (**Figura 21C**). Además, los resultados revelan que no existen diferencias significativas en las presiones de palanca inactiva entre los grupos (**Figura 21B**, ANOVA de MR de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shcofilina/LV-shCtrl): Interacción  $F_{(27-207)} = 0,8078$   $p = 0,7392$ , no-estrés/estrés  $F_{(3-23)} = 0,3498$   $p = 0,7896$  y Tiempo  $F_{(9-207)} = 2,430$   $p < 0,0121$ ), lo cual sugiere que el incremento en la respuesta observada asociada a la presión de la palanca activa es específica y no aleatoria y tiene como finalidad conseguir la droga.

El análisis de los animales estresados y no estresados microinyectados con shcofilina revela que no hay diferencias significativas en el promedio del número de presiones de la palanca activa, inactiva o infusiones de cocaína a lo largo de los 10 días del esquema de adquisición de AA medidos a través del test de Bonferroni, (**Figura 21B-C**).

Asimismo, al analizar las diferencias entre los grupos de animales estresados y microinyectados en NA core con el shCtrl y shcofilina, los resultados muestran diferencias significativas en el número de presiones de la palanca activa e infusiones entre los grupos. Estos resultados revelan que los animales estresados tratados con el shCtrl aumentan la tasa de presión de la palanca activa a los días 6 y 9 del esquema de adquisición de AA (**Figura 21B**) respecto de los animales microinyectados con shcofilina, así como también, incrementan significativamente el número de infusiones autoadministradas a los días 9 y 10 del esquema (**Figura 21C**). Estas diferencias también se evidencian al graficar el número total de infusiones acumuladas de cocaína luego de 10 días del esquema de adquisición, para cada grupo experimental de animales. En la figura 20D se observa que los animales estresados y microinyectados con shCtrl alcanzan, a lo largo de todo el experimento, un número total de infusiones de cocaína superior respecto de los animales estresados crónicamente pero microinyectados con el shcofilina, así como también respecto de los animales no estresados (**Figura 21D**, ANOVA de MR de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shcofilina/LV-shCtrl): Interacción  $F_{(1-23)} = 11,08$ ,  $p =$

0,0029, no-estrés/estrés  $F_{(1-23)} = 9,438$   $p = 0,0054$  y Tratamiento  $F_{(1-23)} = 9,438$   $p = 0,3651$ ).



**Figura 21. Adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína.** A) Modelo experimental. B) Número de presiones en la palanca activa e inactiva a lo largo de los 10 días del esquema experimental. Los valores por día representan las medias  $\pm$  SEM del número de determinaciones. \* $p < 0.05$  comparado con el grupo estrés/LV-shcofilina. # $p < 0.05$  comparado con el grupo NE/shCtrl. B) Número de infusiones de cocaína (0.3 mg/kg/infusión) a lo largo de los 10 días del esquema experimental. Los valores por día representan las medias  $\pm$  SEM del número de determinaciones. \* $p < 0.05$  comparado con el grupo estrés/LV-shcofilina. # $p < 0.05$  comparado con el grupo NE/shCtrl.

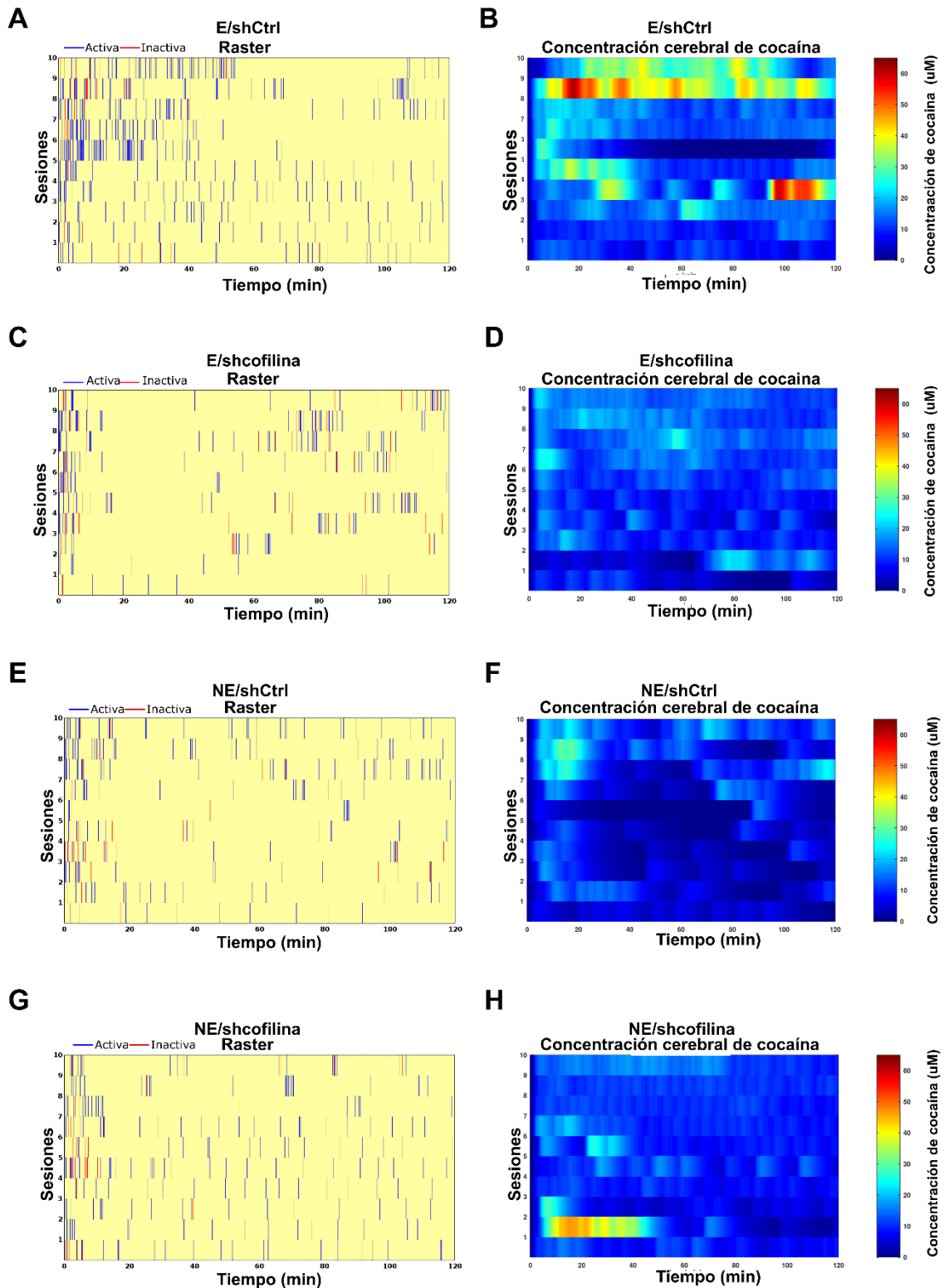
A continuación, para complementar estas observaciones y comprender el efecto de la inhibición de cofilina durante la adquisición de la AA de cocaína inducida por estrés, realizamos rasters que representan las presiones de la palanca activa (azul) e inactiva (rojo) a lo largo de cada sesión de AA, conjuntamente con mapas de color que representan el promedio de las concentraciones cerebrales de cocaína alcanzadas por día a lo largo del esquema de adquisición de la conducta de AA de todos los animales por cada grupo (**Figura 22**). El modelado de las concentraciones cerebrales de cocaína fue desarrollado de acuerdo a lo descrito anteriormente en Materiales y Métodos utilizando como referencia el trabajo de Pan y col (Pan et al., 1991).

El análisis individual del patrón de presiones de la palanca activa e inactiva de los animales estresados y no estresados microinyectados con el shCtrl revela diferencias significativas entre los grupos solo en las palancas activas, tanto en la frecuencia de palanqueo a lo largo de los 10 días del esquema de adquisición de la conducta, así como también durante cada sesión (**Figuras 22A y E**). El modelado de las concentraciones cerebrales de cocaína alcanzadas por día en el grupo de animales estresado tratado con shCtrl muestra que la conducta de consumo se estabiliza a partir del día 7 del esquema de AA y alcanza concentraciones de cocaína cerebral superiores al resto de los grupos a lo largo del esquema de AA (**Figura 22B**). Luego de 9 días del inicio del esquema de adquisición, la concentración cerebral de cocaína se incrementa por encima de los 60uM alcanzando los niveles más altos de consumo en ese día, continuando con concentraciones cerebrales estables no menores a 30uM durante toda la sesión y a lo largo del siguiente día (**Figura 22B**). Los animales del grupo no estresado que fueron microinyectados con el shCtrl mostraron un patrón de consumo a lo largo del esquema de AA que no supera los 30uM de concentración cerebral de cocaína, y una conducta estabilizada de consumo a partir del octavo día de AA (**Figura 22F**).

El análisis del efecto de la inhibición de cofilina (shcofilina) en los animales estresados y no estresados microinyectados en NA core, revela que no presentan diferencias significativas en el análisis individual de los rasters de palancas activas e inactivas durante las sesiones de adquisición (**Figuras 22C y G**), así como tampoco en los modelados de las concentraciones cerebrales de cocaína (**Figuras 22D y H**). Cabe destacar, que se observan diferencias en las respuestas sobre la palanca activa e inactiva en cada animal individual. Esto indica que los animales asociaron correctamente la búsqueda de droga con la presión de la palanca activa y demuestran que el efecto de la inhibición de cofilina sobre la respuesta conductual es específico y no aleatorio. En cuanto a los mapas de modelado de concentración cerebral de cocaína revelan un consumo diario estable de cocaína que alcanza concentraciones cerebrales de 30uM de cocaína en ambos grupos (no-estrés y estrés microinyectado con shcofilina) durante los 10 días consecutivos del esquema de adquisición (**Figura 22D y H**).

La mayor relevancia de estos hallazgos es evidenciada al comparar los dos grupos de animales estresados crónicamente microinyectados en NA core con el shCtrl (**Figura 22A-B**) y shcofilina (**Figura 22E-F**). Esta comparación revela que ambos grupos estabilizaron su patrón de respuesta después de 6 días de consumo, sin embargo, el

grupo/estrés tratado con shCtrl alcanza el doble de niveles cerebrales de cocaína respecto del grupo/estrés tratado con shcofilina. Estos resultados revelan que la proteína cofilina es importante para la adquisición de la conducta de AA, ya que su inhibición en NA core previene la facilitación de la conducta inducida por estrés crónico de inmovilización.

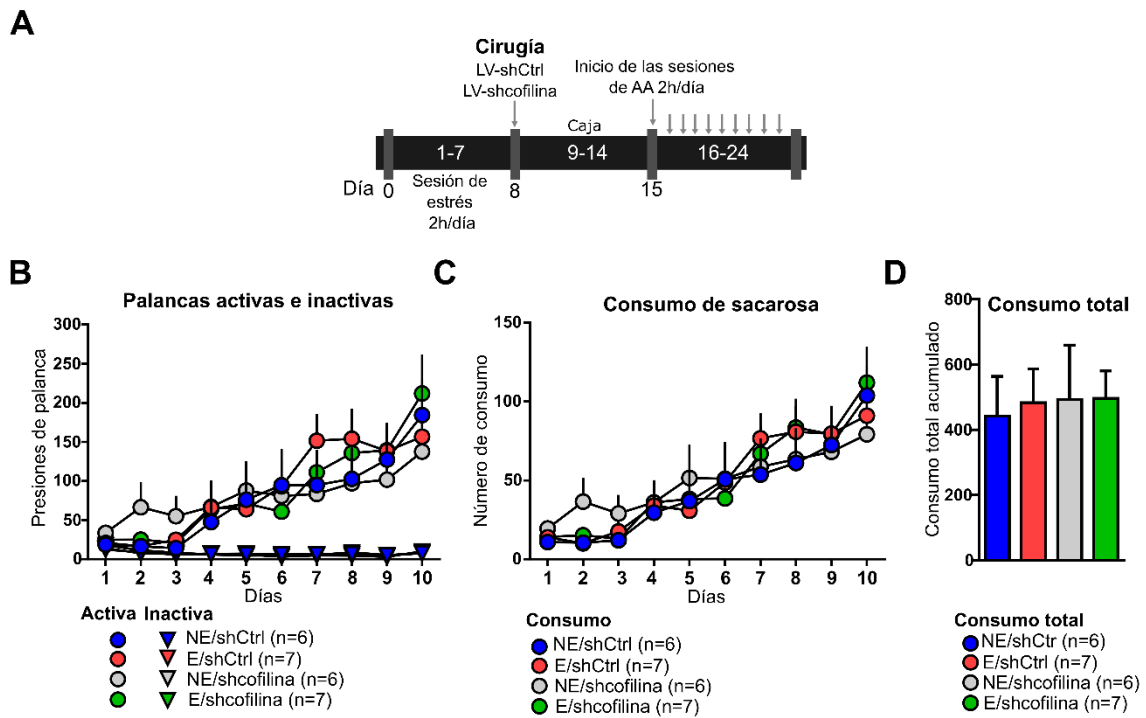


**Figura 22.** Rasters individuales de animales con el mejor desempeño de cada grupo y mapas de modelados cerebrales de cocaína promedio de cada grupo experimental. A y B) Raster y Mapa de concentración de cocaína del grupo E/LV-shCtrl. C y D) Raster y Mapa de concentración de cocaína del grupo E/shcofilina. E y F) Raster y Mapa de concentración de cocaína del grupo NE/shCtrl. G y H) Raster y Mapa de concentración de cocaína del grupo NE/shcofilina.



Por último, con el objetivo de determinar la especificidad de la inhibición de cofilina en NA core sobre la influencia facilitadora del estrés en la adquisición de la conducta de AA de cocaína, evaluamos la ingesta de un reforzador natural (sacarosa) siguiendo el mismo protocolo experimental descrito en Materiales y Métodos, bajo un esquema de AA oral. Brevemente, el experimento inicia una semana después de la cirugía intracraneal (**Figura 23A**) y se mantiene durante 10 días consecutivos. Las **Figuras 23B, C y D** corresponden a los resultados obtenidos en este experimento.

Estos resultados revelan que no existen diferencias significativas en el número de presiones de la palanca activa entre los grupos de animales (**Figura 23B**, ANOVA de MR de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shcofilina/LV-shCtrl): Interacción  $F_{(27-198)} = 0.9093$   $p = 0.5982$ , Tratamiento  $F_{(3-22)} = 0.05047$   $p = 0.9846$  y Tiempo  $F_{(9-198)} = 19.38$   $p < 0.0001$ ), ni en el número de infusiones a lo largo del esquema de adquisición (**Figura 23C**, ANOVA de MR de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shcofilina/LV-shCtrl): Interacción  $F_{(27-198)} = 0.6134$   $p = 0.9338$ , Tratamiento  $F_{(3-22)} = 0.04324$   $p = 0.9877$  y Tiempo  $F_{(9-198)} = 21.70$   $p < 0.0001$ ). De igual modo, los resultados revelan que no hay diferencias en las presiones de la palanca inactiva entre los grupos (**Figura 23B**, ANOVA de MR de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shcofilina/LV-shCtrl): Interacción  $F_{(27-198)} = 0.3239$   $p = 0.9995$ ), Tratamiento  $F_{(3-21)} = 0.9087$   $p = 0.4536$  y Tiempo  $F_{(9-198)} = 5.827$   $p < 0.0001$ ), o en el consumo total de sacarosa por grupo luego de 10 días de AA (**Figura 23D**, ANOVA de MR de dos vías (no-estrés/estrés x LV-shcofilina/LV-shCtrl): Interacción  $F_{(1-23)} = 0.3266$   $p = 0.5732$ , no-estrés/estrés  $F_{(1-23)} = 0.4565$   $p = 0.5060$  y Tratamiento  $F_{(1-23)} = 0.05887$   $p = 0.8104$ ). Estos resultados evidencian que no hay alteraciones en la capacidad de respuesta entre los diferentes grupos de animales al ser expuestos a un reforzador natural, sugiriendo que no existen alteraciones en el estado motivacional al momento del experimento. Todos los animales son capaces de adquirir y mantener la conducta de consumo de sacarosa durante los 10 días de experimento y no se diferencian en el patrón de consumo. Más relevante aún, estas observaciones sugieren que las alteraciones en la dinámica de actina mediadas por cofilina son específicas de la respuesta a cocaína y no modifican el patrón de consumo de reforzadores naturales.



**Figura 23. Adquisición de la conducta de autoadministración oral de sacarosa.** **A)** Modelo experimental. **B)** Número de presiones en la palanca activa e inactiva a lo largo de los 10 días del esquema experimental. Los valores por día representan las medias  $\pm$  SEM del número de determinaciones. **C)** Consumo total de sacarosa acumulado a lo largo de los 10 días del esquema experimental, en donde un consumo equivale a 0.1ml de solución de sacarosa 10%. Los valores por día representan las medias  $\pm$  SEM del número de determinaciones.

*Conclusión parcial del resultado:*

Estas observaciones revelan la influencia facilitadora del estrés en la adquisición de la conducta de AA de cocaína y respaldan la participación de cofilina en la adquisición de AA de cocaína inducida por estrés. Específicamente la inhibición de cofilina en NA core es capaz de prevenir el efecto del estrés en el desarrollo de la conducta adquisición de AA de cocaína, sugiriendo que el rol de cofilina en NA core es crítico en la facilitación inducida por el estrés. Además, estos resultados están fuertemente respaldados por la capacidad de respuesta de los animales cuando se exponen a un reforzador natural que proporciona una valencia de recompensa más alta incluso que la cocaína, lo que sugiere un papel diferencial de la cofilina entre la adquisición del comportamiento de AA de cocaína y sacarosa inducida por el estrés.

---

## **2. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RAC1 EN LA VULNERABILIDAD AL CONSUMO DE COCAÍNA INDUCIDO POR ESTRÉS**

La proteína Rac1, perteneciente a la familia de RhoGTPasas, se encuentra estrechamente asociada a la regulación de la dinámica de actina en las espinas dendríticas (Harris et al., 1992; Hering & Sheng, 2001; Nakayama et al., 2000). En las últimas décadas, numerosos estudios reportaron la participación de vías de señalización molecular intracelular aguas arriba de cofilina, como Rac1 y LIMK1, en la plasticidad sináptica asociada a diferentes paradigmas de estrés en áreas límbicas como NA (Y. Chen et al., 2008; Fan et al., 2018; Gao et al., 2020; S. A. Golden et al., 2013), así como también, se describió la participación de Rac1 en el remodelado dendrítico asociado al incremento de las propiedades reforzantes y estimulantes de cocaína en NA y Cpu (Dietz et al., 2012; J. Li et al., 2015). Específicamente, se propuso que la administración de cocaína disminuye la activación de la proteína Rac1 en NA, promueve el incremento en la actividad de cofilina, y este mecanismo podría ser responsable de la expansión de las espinas dendríticas en NA y del incremento en las propiedades reforzantes de la droga (Dietz et al., 2012). En el presente estudio caracterizamos la participación de Rac1 en un modelo de sensibilización cruzada entre estrés y cocaína, a partir de la hipótesis de que la exposición a estrés regula negativamente la actividad de la proteína Rac1, promoviendo la actividad de cofilina, y este mecanismo podría ser responsable de los cambios plásticos y conductuales asociados al incremento de la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducido por estrés.

### **2.1 Curso temporal de niveles de expresión de las proteínas Rac, cofilina, p-cofilina y actina luego de la infección de las partículas virales de Rac1 constitutiva activa y Rac1 dominante negativa en NA core**

Con el objetivo de caracterizar el rol de la proteína Rac1 en la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducido por estrés utilizamos dos lentivirus que contienen una mutación en el dominio G12V para mantener la proteína en su estado activo unida a GTP (LV-Rac CA), o en el dominio T17N para mantener la proteína en estado inactivo unida a GDP (LV-Rac DN). Como control utilizamos un lentivirus que contiene un plásmido vacío, denominado LV-Ctrl. Los lentivirus son microinyectados en NA core mediante cirugía estereotáxica y luego de transcurridos 5, 10, y 15 días de expresión, los animales son sacrificados y se toman muestras de tejido de NA. Mediante Western blot se

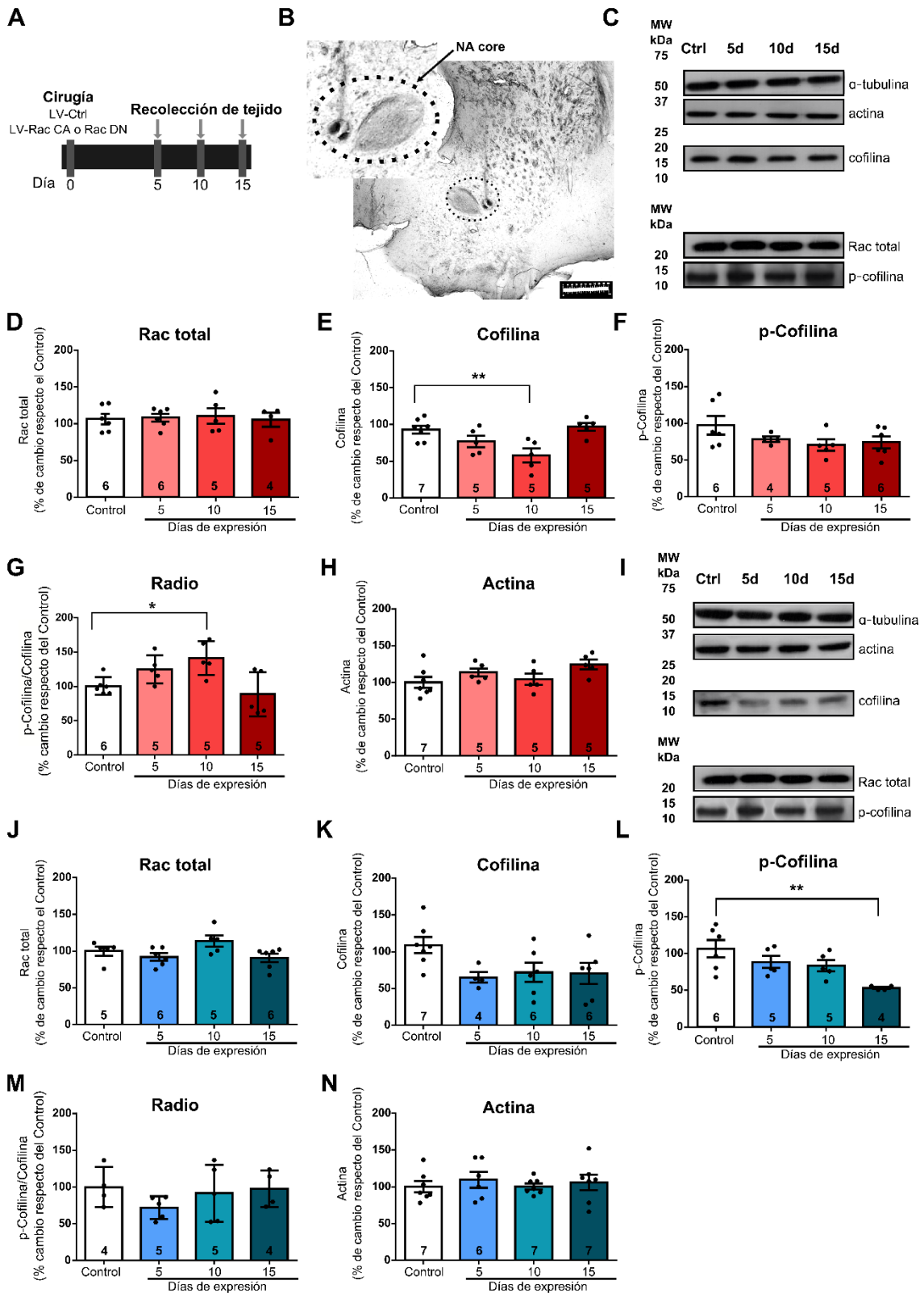
determina la expresión de las proteínas Rac1, cofilina total (cofilina), p-cofilina (forma inactiva), actina (actina) y el ratio de p-cofilina respecto de cofilina (p-cofilina/cofilina) (**Figura 24A**). La **Figura 24B** representa un sitio de infección en NA core (delimitado con línea punteada) teñido con azul de cresil violeta, se observa la caída de cánula y la correspondiente inyección del lentivirus. La **Figura 24C** es una representación de las corridas de Western blot para cada proteína utilizada para las cuantificaciones realizadas luego de la inyección en NA core de LV-Rac CA. Las **Figuras 24D-H** representan las mediciones de los niveles totales de cada proteína luego de la inyección en NA core de LV-Rac CA. La **Figura 24I** es una representación de las corridas de Western Blot para cada proteína utilizadas para las cuantificaciones realizadas luego de la inyección en NA core de LV-Rac DN, mientras que las **Figuras 24J-L** representan las mediciones de los niveles totales de cada proteína luego de la inyección en NA core de LV-DN.

Las determinaciones analizadas por Western blot de las muestras obtenidas luego de la microinyección en NA core con partículas lentivirales que expresan la proteína Rac1 constitutiva activa (LV-Rac CA) muestran que no se producen modificaciones en los niveles de expresión de Rac1 luego de 5, 10 y 15 días post infección (**Figura 24D**, Análisis de varianza de una vía, Tratamiento  $F_{(3-17)} = 0,07441$   $p = 0,9729$ , seguido del Test de Bonferroni). Sin embargo, estos resultados muestran modificaciones en los niveles de expresión de cofilina total luego del tratamiento con LV-Rac CA (**Figura 24E**, Análisis de varianza de una vía, Tratamiento  $F_{(3-18)} = 6,154$   $p = 0,0046$ ). Específicamente, se evidencia una disminución significativa en los niveles de expresión de cofilina luego de transcurridos 10 post infección de LV-Rac CA en NA respecto del control (Bonferroni *pos-hoc*, Día 10 vs Control,  $*p < 0,05$ ). Sin embargo, cabe mencionar que esta disminución de los niveles de la proteína cofilina comienza a observarse a los 5 días post infección, aunque es estadísticamente diferente recién a partir del día 10. Asimismo, los resultados revelan que no se producen modificaciones en los niveles de expresión de la proteína p-cofilina (inactiva) a lo largo del curso temporal (**Figura 24F**, Análisis de varianza de una vía, Tratamiento  $F_{(3-17)} = 1,691$   $p = 0,2066$ , seguido del Test de Bonferroni), pero muestran modificaciones en el ratio p-cofilina/cofilina luego del tratamiento con LV-Rac CA en NA core (**Figura 24G**, Análisis de varianza de una vía, Tratamiento  $F_{(3-17)} = 5,414$   $p = 0,0084$ ). Específicamente se observa un incremento significativo en el ratio luego de transcurridos 10 días de la microinyección de LV-Rac CA respecto del control (Bonferroni *pos-hoc*, Día 10 vs Control,  $*p < 0,05$ ). Los

---

resultados revelan que no se producen modificaciones en los niveles totales de expresión de actina a lo largo del curso temporal (**Figura 24H**, Análisis de varianza de una vía, Tratamiento  $F_{(3-18)} = 2,305$   $p = 0,111$ ; seguido del Test de Bonferroni).

Por otra parte, las determinaciones analizadas por Western blot de las muestras obtenidas luego de la microinyección en NA core con las partículas virales que expresan la mutación dominante negativa de Rac1 (LV-Rac DN) muestran que no se producen cambios significativos en los niveles totales de expresión de la proteína Rac1 luego de 5, 10 o 15 días post infección (**Figura 24J**, Análisis de varianza de una vía, Tratamiento  $F_{(3-18)} = 2,866$   $p = 0,0654$ ; seguido del Test de Bonferroni). Asimismo, las determinaciones revelan que los niveles totales de expresión de cofilina post-infección con LV-Rac DN no se modifican a lo largo del curso temporal (**Figura 24K**, Análisis de varianza de una vía, Tratamiento  $F_{(3-19)} = 2,798$   $p = 0,680$ ; seguido del Test de Bonferroni). Sin embargo, estos resultados muestran que los niveles de expresión de la proteína p-cofilina (inactiva) disminuyen paulatinamente desde el día 5 post infección, y son significativamente diferentes del control luego de 15 días post infección (**Figura 24L**, Análisis de varianza de una vía, Tratamiento  $F_{(3-16)} = 5,382$   $p = 0,0094$ , seguido del Test de Bonferroni: Día 15 vs Control  $*p < 0.05$ ). Asimismo, los resultados revelan que no se producen modificaciones en el ratio p-cofilina/cofilina a lo largo del curso temporal (**Figura 24M**, Análisis de varianza de una vía, Tratamiento  $F_{(3-14)} = 0,9517$   $p = 0,4424$ ; seguido del Test de Bonferroni). El análisis de las determinaciones muestra que los niveles de actina no se modifican por el tratamiento de LV-Rac DN en NA core (**Figura 24N**, Análisis de varianza de una vía, Tratamiento  $F_{(3-25)} = 0,2684$   $p = 0,8475$ ; seguido del Test de Bonferroni).



**Figura 24.** Curso temporal de los niveles totales de expresión de las proteínas Rac, cofilina, p-cofilina, radio de p-cofilina/cofilina y actina post infección intra-NA core con LV- Rac CA y LV- Rac DN. Los datos representan la media ± SEM del número de mediciones realizadas para cada gráfico. Los datos son analizados mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguido del Test de Bonferroni. A) Modelo

experimental. **B)** Imagen representativa del sitio de infección con las partículas virales de Rac1, teñido con azul de cresil violeta (2.5x). La línea punteada denota el área de NA core infectada. **C)** Imágenes representativas de las corridas de Western blot para cada proteína medida.  $\alpha$ -tubulina se utiliza en cada corrida como control de carga luego de la infección con LV-Rac CA. **D)** Niveles de expresión de Rac1 total en NA core luego de la infección con LV-Rac CA. **E)** Niveles de expresión de cofilina total en NA core luego de la infección con LV-Rac CA. **F)** Niveles de expresión de p-cofilina en NA core luego de la infección con LV-Rac CA. **G)** Radio de p-cofilina/cofilina en NA core luego de la infección con LV-Rac CA. **H)** Niveles de expresión de actina total en NA core luego de la infección con LV-Rac CA. **I)** Imágenes representativas de las corridas de Western blot para cada proteína medida.  $\alpha$ -tubulina se utilizó en cada corrida como control de carga luego de la infección con LV-Rac DN. **J)** Niveles de expresión de Rac1 total en NA core luego de la infección con LV-Rac DN. **K)** Niveles de expresión de cofilina total en NA core luego de la infección con LV-Rac DN. **L)** Niveles de expresión de p-cofilina en NA core luego de la infección con LV-Rac DN. **M)** Radio de p-cofilina/cofilina en NA core luego de la infección con LV-Rac DN. **N)** Niveles de expresión de actina total en NA core luego de la infección con LV-Rac DN.

#### *Conclusión parcial del resultado:*

Los resultados ponen en evidencia la funcionalidad *in vivo* de las partículas virales utilizadas como herramienta molecular para modificar la actividad de la proteína Rac1 en NA core. Estos resultados muestran que no se producen cambios en los niveles totales de expresión de Rac1 luego del tratamiento en NA core con LV-Rac CA y LV-Rac DN. Sin embargo, considerando que la actividad de la proteína cofilina es regulada por fosforilación y depende en parte de la activación de la proteína Rac1, determinar los niveles de expresión de cofilina, p-cofilina y su respectivo radio podrían ser utilizados como indicadores de la activación de la vía que involucra a Rac1/PAK/LIMK1 y cofilina. Así, el incremento en la conformación activa de Rac1 luego de la infección en NA core con LV-Rac CA se correlaciona con la disminución de los niveles totales de expresión de cofilina, y el incremento del radio p-cofilina/cofilina, sugiriendo que dicho tratamiento favorece la estabilización de actina en NA. Siguiendo la misma línea, la infección de LV-Rac DN en NA core induce alteraciones en la expresión de p-cofilina, mientras que la expresión de cofilina total y el respectivo radio p-cofilina/cofilina no es modificado, y permitiría inferir un patrón opuesto en la regulación de la dinámica de actina en NA inducido por LV-Rac DN respecto al descripto previamente luego del tratamiento con LV-Rac CA en NA core.

## 2.2 La activación de la proteína Rac1 en NA core regula la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés.

En el presente trabajo describimos la participación de cofilina en la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés (**Figura 17**), así como también su rol durante la vulnerabilidad al consumo de cocaína (**Figura 21**). Nuestros resultados revelan que la inhibición de cofilina en NA core previene la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés, así como también, la facilitación de la adquisición de la conducta de AA de cocaína inducida por estrés crónico.

Considerando que la activación de cofilina está mediada en parte por la activación de Rac1, y que este mecanismo molecular ha sido previamente descrito en respuesta al consumo de cocaína (Dietz et al., 2012), en el presente trabajo caracterizamos la participación de Rac1 en el fenómeno de sensibilización conductual inducida por estrés. Brevemente, animales estresados crónicamente y no estresados son microinyectados en NA core con las partículas virales que expresan la mutación constitutiva activa de Rac1 (LV-Rac CA) o el lentivirus que expresa la mutación dominante negativa (LV-Rac DN) o el lentivirus control (LV-Ctrl) y luego de una inyección aguda de solución salina i.p. (Sal) o cocaína 10mg/kg i.p. (Coc) se evalúa la expresión de la sensibilización (**Figura 25A**). La **Figura 25B** representa los sitios de microinyección de los lentivirus en NA core (señalados con puntos negros) obtenidos según el atlas Paxinos y Watson (Paxinos G & Watson C., 2007). Las **Figuras 25C-F** representan las mediciones de actividad locomotora obtenidas para cada grupo experimental luego de una inyección aguda de solución salina o cocaína i.p.

El registro de la actividad locomotora, expresada como el número de cuentas en función del tiempo (**Figura 25C**), revela que la microinyección del lentivirus que expresa la mutación constitutiva activa de Rac1 (LV-Rac CA) previene la expresión conductual de la sensibilización. Asimismo, la expresión de la mutación de Rac1 en su estado activo (LV-Rac CA) en NA core no induce alteraciones en la actividad locomotora en respuesta a salina ni en la respuesta conductual a cocaína observada en los animales del grupo no estresados (**Figura 25C**, ANOVA de MR de dos vías (no-estrés/estrés x LV-Rac CA/LV-Ctrl): Tiempo,  $F_{(17-425)} = 17,38$   $p < 00001$ ; no-estrés vs estrés,  $F_{(3-25)} = 8,476$   $p = 0.0005$ ; Interacción,  $F_{(51-425)} = 2,545$   $p = 0.0001$ ). El test de Bonferroni indica que el grupo estrés/Ctrl se diferencia significativamente de los grupos no estresados (no-estrés/Ctrl y no-estrés/Rac CA) entre los 70 y 130 minutos del experimento ( $*p < 0.05$ , entre los 70 y

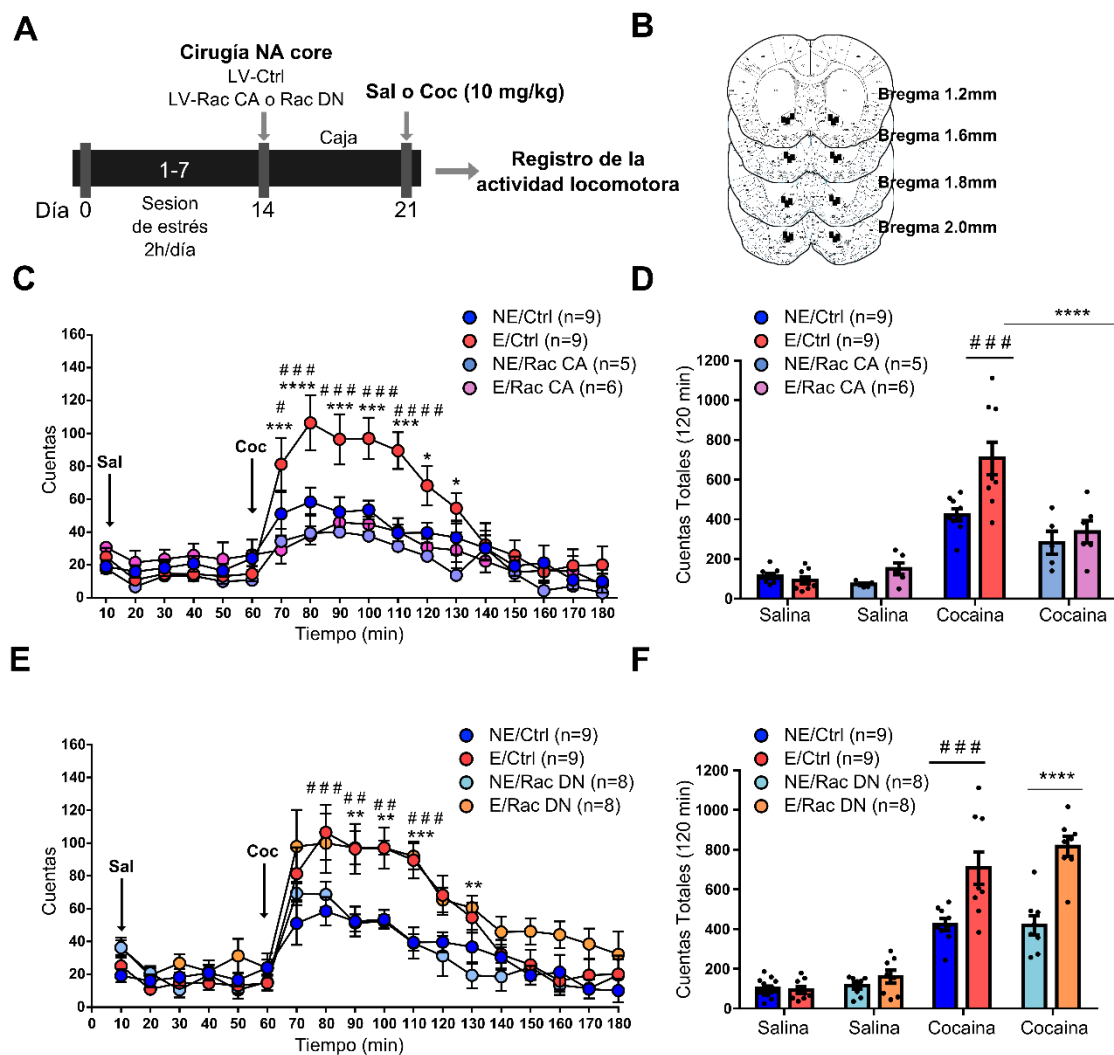


130 minutos). Además, el grupo estrés/Ctrl incrementa significativamente la actividad locomotora entre los 70 y 110 minutos del test, es decir 10 minutos luego de la inyección de cocaína, comparado con el grupo estrés/LV-Rac1 CA ( $\#p < 0.05$ , entre los 70 y 110 minutos).

Por otra parte, luego de la inyección de solución salina los resultados revelan que no se producen diferencias en la respuesta conductual entre los diferentes grupos experimentales (Bonferroni *post-hoc*  $p > 0.05$  entre los 0 y 60 minutos). Además, la representación de la actividad locomotora expresada como el número de cuentas totales durante 120 minutos luego de la inyección de salina y cocaína, refleja el incremento en la actividad locomotora del grupo estrés/Ctrl en respuesta a la inyección aguda de cocaína con respecto al resto de los grupos (estrés o no-estrés tratados con LV-Rac CA y no-estrés tratados con LV-Ctrl) (**Figura 25D**, ANOVA de dos vías, no-estrés/estrés x LV-Rac1 CALV-Ctrl): Tratamiento  $F_{(3-57)} = 61,94$   $p < 0.0001$ ; no-estrés vs estrés  $F_{(1-51)} = 11.70$   $p = 0,0012$ ; Interacción  $F_{(3-57)} = 5,312$   $p = 0.0027$ ). Específicamente estos resultados muestran que el estrés crónico regula negativamente la actividad de la RhoGTPasa Rac1, ya que la expresión de la mutante constitutiva activa de Rac1 en NA core previene la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por la exposición a estrés.

Siguiendo el esquema experimental mencionado anteriormente (**Figura 25A**), analizamos la influencia de la expresión de la proteína Rac1 dominante negativa (en su estado inactivo) en la sensibilización conductual a cocaína luego de la exposición a estrés crónico (**Figura 25E-F**). El registro de la actividad locomotora, expresada como el número de cuentas en función del tiempo (**Figura 25E**), revela que no se revierte la expresión conductual de la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína luego de la microinyección en NA core del lentivirus que expresa la mutación dominante negativa de Rac1 (LV-Rac DN). Además, la expresión de la mutación de Rac1 en su estado inactivo en NA core no induce alteraciones en la actividad locomotora en respuesta a salina ni en la respuesta a cocaína observada en los animales del grupo no-estresados (**Figura 25E**, (ANOVA de MR de dos vías, no-estrés/estrés x LV-Rac1 DN/LV-Ctrl): Tiempo,  $F_{(17-510)} = 33,99$ ,  $p < 00001$ ; no-estrés vs estrés  $F_{(3-30)} = 10,42$ ,  $p < 00001$ ; Interacción  $F_{(51-510)} = 1,913$ ,  $p = 0.0003$ ). El test de Bonferroni revela que el grupo estrés/Ctrl incrementa significativamente la actividad locomotora entre los 80 y 110 minutos del test, comparado con el grupo no estresado microinyectado con LV-Ctrl ( $\#p < 0.05$ , entre los 80 y 110 minutos). Además, el grupo estrés/Rac DN incrementa significativamente la actividad

locomotora entre los 70 y 110 minutos luego de la inyección de cocaína comparado con el grupo no-estrés/Rac DN ( $*p < 0.05$ , entre los 70 y 110 minutos). De manera relevante, los resultados revelan que no hay diferencias en la respuesta conductual entre los animales estresados microinyectados con LV-Ctrl y LV-Rac DN en NA core. Además, la representación de la actividad locomotora, expresada como el número de cuentas totales durante 120 minutos luego de la inyección de salina y cocaína, refleja el incremento en la actividad locomotora del grupo estrés/Ctrl y estrés/Rac DN en respuesta a la inyección aguda de cocaína con respecto a los grupos no estresados (tratados con LV-Rac DN y con LV-Ctrl) (**Figura 25F**, (ANOVA de dos vías de RM, no-estrés/estrés x LV-Rac DN/LV-Ctrl): Tratamiento  $F_{(3-65)} = 93,48$ ,  $p < 0.0001$ ; no-estrés vs estrés  $F_{(1-65)} = 39,22$   $p < 0.0001$ ; Interacción  $F_{(3-65)} = 11,42$   $p < 0.0001$ ).



**Figura 25. Registro de la actividad locomotora.** Actividad locomotora luego de cocaína (10 mg/kg i.p.) en ratas microinyectadas en NA core con LV-Ctrl (1ul/lado) o LV-Rac CA (1ul/lado), LV-Rac DN

(1ul/lado), medido dos semanas después del estrés repetido. Después de una media hora de habituación en las cajas de testeo, los animales No estrés/shCtrl (n=9), Estrés/shCtrl (n=9), No estrés/LV-CA (n=5) y Estrés/LV-CA (n=6), No estrés/LV-DN (n=8) y Estrés/LV-DN (n=8) reciben una inyección i. p de solución salina y fueron testeados durante una hora, seguido de una inyección i.p. de cocaína y fueron monitoreados durante dos horas (120 min). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de las cuentas obtenidas en intervalos de 10 min. **A)** Diseño experimental. **B)** Secciones representativas del cerebro de rata en las cuales se muestran los sitios de microinyección de lentivirus en NA core delimitadas con puntos negros. **C)** Cuentas cada 10 minutos de la actividad locomotora en función del tiempo. La flecha indica la inyección de salina y cocaína i.p 10 mg/kg. \* $p < 0.05$  comparado con los grupos No estrés, # $p < 0.05$  comparado con Estrés/LV-CA. **D)** Cuentas totales 120 min después de la inyección de salina y cocaína. # $p < 0.05$  comparado con el resto de los grupos. \* $p < 0.05$  comparado con el grupo Estrés/LV-Rac CA. **E)** Cuentas cada 10 minutos de la actividad locomotora en función del tiempo. La flecha indica la inyección de salina y cocaína i.p 10 mg/kg. # $p < 0.05$  Estrés/LV-Ctrl comparado con No estrés/LV-Ctrl. \* $p < 0.05$  Estrés/LV-DN comparado con No Estrés/LV-DN. **F)** Cuentas totales 120 min después de la inyección de salina y cocaína. \* $p < 0.05$  Estrés/LV-Ctrl comparado con No estrés-LV-Ctrl. # $p < 0.05$  Estrés/LV-Rac DN comparado con el grupo No Estrés/LV-Rac DN.

#### *Conclusión parcial de resultado:*

Estos resultados revelan la participación de la RhoGTPasa Rac1 en la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés en NA core. Específicamente, la exposición a estrés crónico incrementa la sensibilización conductual a cocaína a través de la disminución de la actividad de Rac1 en NA core. Esto es puesto en evidencia, ya que la expresión la mutante de Rac1 constitutiva activa en NA previene la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés. Mientras que, luego de la expresión de la mutante de Rac1 dominante negativa se observa la respuesta sensibilizada a cocaína inducida por estrés, similar a la de los animales estresados y tratados con el LV-Ctrl.

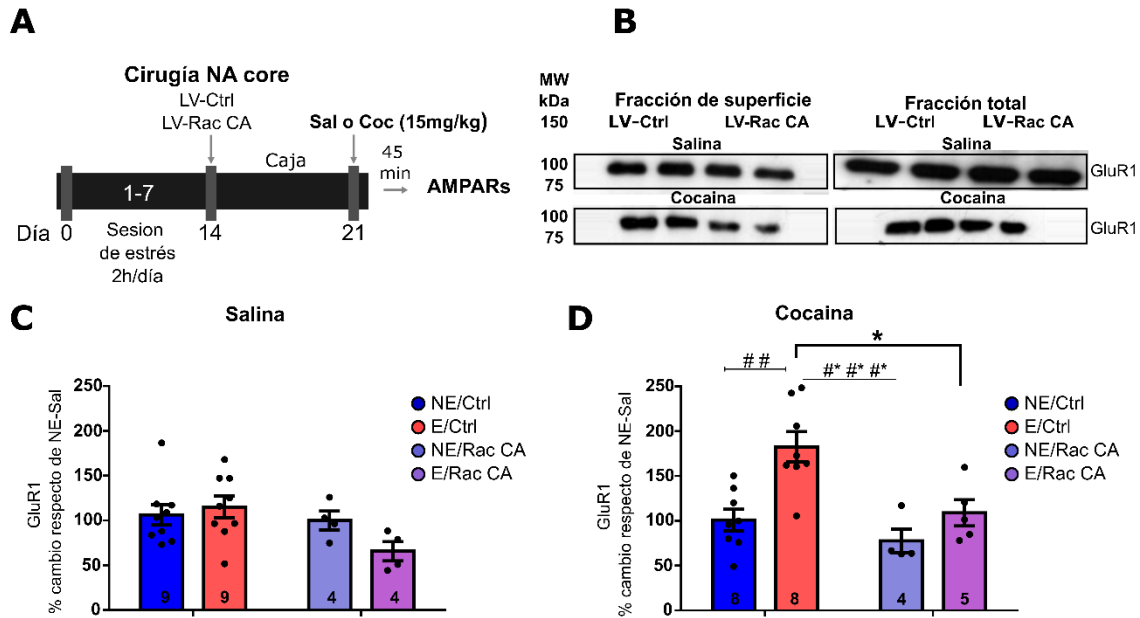
### **2.3 La activación de la proteína Rac1 en NA core previene el incremento de receptores AMPA en superficie luego de una inyección aguda de cocaína**

Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés está acompañada del incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie en NA core (Esparza et al., 2012; Garcia-Keller et al., 2013). Los resultados obtenidos en el presente trabajo respaldan las observaciones previas y revelan que la inhibición de cofilina en NA core previene la respuesta sensibilizada a cocaína inducida por estrés crónico (**Figura 17**), así como

también, el incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie en NA core en animales estresados crónicamente luego de la cocaína (**Figura 20**). Además, la expresión de la mutante de Rac1 constitutiva activa en NA core previene la expresión de la sensibilización a cocaína inducida por estrés (**Figura 25**).

En el presente estudio evaluamos la influencia de la proteína Rac1 en la expresión de receptores AMPA de superficie en NA core en animales estresados crónicamente y no estresados microinyectados con el lentivirus control (LV-Ctrl) y el lentivirus que expresa la mutante de Rac1 constitutiva activa (LV-Rac CA), 45 min después de una inyección no contingente de cocaína de 15mg/kg o solución salina (**Figura 26A**). Los grupos experimentales analizados durante este experimento son los siguientes: NE/Ctrl-Sal, E/shCtrl-Sal, NE/Rac CA-Sal, E/Rac CA-Sal, NE/Ctrl-Coc, E/Ctrl-Coc, NE/Rac CA-Coc y E/Rac CA-Coc. La **Figura 26B** representa las corridas electroforéticas de Western blot inmunomarcadas con un anticuerpo anti-GluR1 y las **Figuras 26C** y **D** representan las cuantificaciones obtenidas para este experimento.

Estos resultados revelan un incremento en la expresión de receptores de tipo AMPA en superficie en respuesta a una inyección aguda de cocaína en los animales estresados crónicamente microinyectados en NA core con LV-Ctrl respecto del resto de los grupos (no-estrés y estrés tratados con LV-Rac CA y no-estrés tratados con LV-Ctrl) (**Figura 26D**). Asimismo, los resultados muestran que el incremento de receptores AMPA inducido por cocaína, no ocurre en los animales estresados microinyectados con LV-Rac CA, respecto de los animales estresados (**Figura 26D**, ANOVA de dos vías (no-estrés/estrés x LV-Rac CA cocaína/LV-Ctrl cocaína): no-estrés vs estrés  $F_{(1-19)} = 19.21$ ,  $p = 0.0003$ , Interacción  $F_{(1-19)} = 3.138$ ,  $p = 0.0925$  y LV-Rac CA vs LV-Ctrl  $F_{(1-19)} = 9.094$   $p = 0.0071$ , seguido del Test de Bonferroni). Por otra parte, los resultados revelan que luego de la inyección aguda de solución salina no se producen cambios significativos en la expresión de receptores AMPA en superficie entre los grupos experimentales mencionados (**Figura 26C**, ANOVA de dos vías (no-estrés/estrés x LV-Rac CA salina/LV-Ctrl salina): no-estrés vs estrés  $F_{(1-20)} = 0.4282$ ,  $p = 0.5203$ , Interacción  $F_{(1-20)} = 1.483$ ,  $p = 0.2375$  y LV-Rac CA vs LV-Ctrl  $F_{(1-20)} = 2.1617$   $p = 0.1214$ , seguido del Test de Bonferroni).



**Figura 26. Efecto de sobreexpresión de Rac1 constitutiva activa en la expresión de receptores AMPA de superficie en animales estresados luego de la cocaína.** Expresión de receptores AMPA de superficie en animales estresados y no estresados microinyectados con LV-Ctrl y LV-Rac CA, 45 min luego de una inyección aguda de solución salina i.p. o cocaína (15 mg/kg). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM del número de determinaciones. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías, seguido del Test de Bonferroni. **A)** Modelo experimental. **B)** Imágenes representativas de las corridas de Western Blot para GluR1. **C)** Expresión de receptores AMPA de superficie luego de 45 min de una inyección aguda de solución salina i.p. (n=4-9) **D)** Expresión de receptores AMPA de superficie luego de 45 minutos de una inyección aguda de cocaína 15 mg/kg i.p. (n=8-5). \* $p < 0.05$  comparado Estrés/LV-Rac CA. # $p < 0.05$  comparado con No estrés/LV-Ctrl. #\* $p < 0.05$  comparado con No estrés/LV-Rac CA.

*Conclusión parcial de resultado:*

Estos resultados sugieren que la proteína Rac1 está involucrada en los cambios bioquímicos asociados a la sensibilización conductual en respuesta a cocaína, inducidos por la exposición previa a estrés. Esto se evidencia ya que la expresión de la mutante de Rac1 constitutiva activa en NA core previene el incremento de receptores AMPA de superficie inducido por la exposición a cocaína en ratas estresadas, lo cual nos permite inferir que durante la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés se produce una regulación negativa de la actividad de Rac1 en NA core.

*Conclusión final de los resultados obtenidos:*

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la inhibición de la expresión de cofilina en el NA core de animales estresados, previene la expresión de sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés y estos resultados conductuales se correlacionan con la reversión en el incremento en la expresión de receptores AMPA luego de una inyección de cocaína en animales estresados. Además, la inhibición de cofilina en el NA core de animales previamente expuestos a estrés modula los cambios estructurales inducidos por cocaína. En este sentido, los bajos niveles de expresión de cofilina previenen el incremento en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas inducido por cocaína en el NA core de animales previamente estresados, y modulan la densidad de espinas dendríticas inducida por estrés. Por último, los bajos niveles de expresión de cofilina en NA core previenen la facilitación de la adquisición de la AA de cocaína inducida por estrés y esta respuesta fue específica para cocaína, ya que los bajos niveles de expresión de cofilina no afectaron la adquisición de la conducta de AA de sacarosa.

En esta línea, la sobreexpresión de una mutante de Rac1 constitutiva activa, en el NA core de ratas expuestas a estrés crónico previene la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés, así como también, revierte el incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie luego de una inyección de cocaína en animales estresados, resultado que permite establecer una correlación con los parámetros conductuales obtenidos.

# DISCUSIÓN

---

En este trabajo de tesis abordamos el estudio de la vía de señalización de la RhoGTPasa Rac1 y la modulación de la actividad de cofilina en la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducida por la exposición a estrés crónico a partir de la hipótesis de que la exposición a estrés disminuye la actividad de Rac1 y es responsable de la expansión de las espinas dendríticas, a través de un mecanismo mediado por cofilina, en las MSNs del NA core. Caracterizamos la función de cofilina en la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por la exposición a estrés crónico y durante la adquisición de la conducta de AA de cocaína. Además, caracterizamos la función de cofilina en los cambios plásticos en la postsinapsis glutamatérgica del NA core inducidos por estrés crónico y en los cambios estructurales inducidos por estrés luego de la administración de cocaína en el NA core, y su asociación con la expresión de la sensibilización conductual. En esta misma línea, caracterizamos la participación de la RhoGTPasa Rac1 en la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés y en los cambios en la postsinapsis glutamatérgicas del NA core inducidos por estrés luego de la administración de cocaína.

Los principales hallazgos de este trabajo demuestran que tanto la inhibición de la expresión de cofilina, así como la sobreexpresión de una mutante de Rac1 constitutiva activa, en el NA core de ratas expuestas a estrés crónico, (1) son capaces de prevenir la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés, (2) estos resultados conductuales se correlacionan con la reversión en el incremento en la expresión de receptores AMPA luego de una inyección de cocaína en animales estresados, además (3) la inhibición de cofilina en el NA core de animales previamente expuestos a estrés modula los cambios estructurales inducidos por cocaína. En primer lugar, los bajos niveles de expresión de cofilina previenen el incremento en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas inducido por cocaína en el NA core de animales estresados, y en segundo lugar, los bajos niveles de expresión de cofilina en el NA core impiden el rápido remodelado del citoesqueleto de actina en respuesta a la cocaína y modulan la densidad de espinas dendríticas inducida por estrés, y por último, (4) los bajos niveles de expresión de cofilina en NA core son capaces de prevenir la facilitación de la adquisición de la AA de cocaína inducida por estrés. Además, esta respuesta es específica para cocaína, ya que los bajos niveles de expresión de cofilina no afectaron la adquisición de la conducta de AA de sacarosa.



---

## 1. PARTICIPACION DE COFILINA EN LA VULNERABILIDAD AL CONSUMO DE COCAÍNA INDUCIDA POR ESTRÉS EN EL NA CORE

La reorganización de las conexiones sinápticas en el cerebro, o plasticidad estructural, permite la formación de nuevos aprendizajes asociados a un comportamiento, y con el tiempo la formación de memorias (Kruijssen & Wierenga, 2019). Las espinas dendríticas son el sitio postsináptico utilizado por las sinapsis excitatorias glutamatérgicas del SNC para comunicarse en respuesta a diferentes estímulos (Depoy et al., 2017) y es ampliamente aceptado que los cambios en el número, la morfología y tamaño de las espinas dendríticas son eventos críticos en la plasticidad sináptica de los circuitos neuronales (Bailey et al., 2015; Lai & Ip, 2013). La actina es el principal componente estructural de las espinas dendríticas, y el crecimiento de las espinas requiere el remodelado del citoesqueleto de actina (Matsuzaki et al., 2004). El ensamblado y desensamblado de actina (dinámica de actina) dentro de las espinas, permite la reorganización de las conexiones sinápticas, y regula los cambios en el número y la morfología de las espinas, así como también, la inserción de proteínas en la PSD (Ehlers, 2000; Matus, 2005; McGee & Brecht, 2003; Rao & Craig, 2000; H. Wang et al., 2005).

Tras la inducción del LTP (Lisman, 2003; Nimchinsky et al., 2002), la actina presente en las espinas y varias proteínas (ABPs en inglés “*actin binding proteins*”), que interactúan directamente con la actina (como por ejemplo Arp 2/3 y cofilina), están implicadas el crecimiento de las espinas (Bosch et al., 2014; Dos Remedios et al., 2003). En particular, cofilina y Arp2/3 se acumulan en la espina y aumentan rápidamente durante el crecimiento máximo de la espina, y la concentración de cofilina en la cabeza de la espina permanece elevada durante al menos 30 min. La actividad de cofilina es regulada por fosforilación (inactivación, p-cofilina) y desfosforilación (activación) de un residuo de serina conservado en la posición 3 (Ser3) de la proteína, lo cual determina la unión de la cofilina a la actina. Luego de la inducción del LTP, cofilina es fosforilada por LIMK1, su efector aguas arriba en la vía de señalización molecular (Bosch et al., 2014) y el incremento de p-cofilina es necesario para el pico de crecimiento de las espinas y la fase posterior de meseta del crecimiento de las espinas (Noguchi et al., 2016). En los primeros minutos, la cofilina fosforilada presumiblemente corta los filamentos de actina y, por lo tanto, aumenta la nucleación de nuevos filamentos de actina y la ramificación producida por el complejo Arp2/3, que resulta en el crecimiento de la espina. Después de esta fase

---

inicial, cofilina es desfosforilada nuevamente y puede decorar filamentos de actina y estabilizarlos. Esta secuencia dinámica y compleja de activación e inactivación de cofilina es un evento crítico para la regulación de la función sináptica, ya que no solo modifica la morfología de las espinas, sino también, el tráfico y la acumulación de receptores AMPA dentro de las sinapsis, durante el LTP (Bamburg, 1999; Bosch et al., 2014; Gu et al., 2010; Kruyer et al., 2019; Mizuno, 2013; Noguchi et al., 2016; Rust, 2015; Rust et al., 2010). De esta manera, las adaptaciones moleculares ocurridas dentro de las espinas dendríticas son las encargadas de mediar la plasticidad sináptica y estructural inducida por estímulos en la transmisión excitatoria (Lisman, 2003; Nimchinsky et al., 2002).

Una característica de la adicción es la persistencia del comportamiento luego de periodos de abstinencia, así como, la recaída continua asociada a claves previamente vinculadas con la droga (Bobadilla et al., 2017; Kalivas & O'Brien, 2008). Numerosa evidencia sugiere que las drogas de abuso pueden usurpar mecanismos de plasticidad en el circuito mesocorticolímbico, a través de los cuales pueden alterar el comportamiento a largo plazo (Kalivas & O'Brien, 2008; Kauer & Malenka, 2007). Considerando el papel fundamental que tiene la dinámica de actina en la plasticidad estructural y funcional de las espinas dendríticas, algunos investigadores sugirieron que los psicoestimulantes, a través de alteraciones en patrones de expresión y/o fosforilación de ABPs, podían reorganizar el citoesqueleto de actina, provocando el desarrollo de adaptaciones conductuales a largo plazo asociadas con la adicción. En este sentido, Toda y col (Toda et al., 2006) publicaron uno de los primeros trabajos que demuestra que durante la abstinencia a cocaína, luego de un tratamiento crónico con la droga, se producen cambios duraderos en la dinámica de actina en el NA a través de alteraciones en los niveles de expresión y fosforilación de ABPs. Este trabajo reportó que durante la abstinencia a cocaína se produce un incremento en la depolimerización de actina en el NA, mediado por la disminución de p-cofilina y su efector aguas arriba LIMK1. Además, el incremento de la dinámica de actina desencadenada por el consumo de cocaína crónico fue vinculado con el restablecimiento de la búsqueda de cocaína en animales previamente entrenados para autoadministrarse la droga (Toda et al., 2006). Específicamente, la inyección de Latrunculina A, una droga depolimerizante de actina, en el NA de estos animales, previno el restablecimiento de la búsqueda de cocaína. Por lo tanto, este trabajo propuso que los cambios duraderos en la organización de la actina durante la abstinencia a la cocaína están mediados por LIMK1 y p-cofilina, y contribuyen a plasticidad dependiente de la

---

experiencia, ya que se encuentran implicados en la búsqueda de la droga. Este trabajo sugiere que las modificaciones en la dinámica de actina podrían estar implicadas en las neuroadaptaciones estructurales y funcionales originadas en la postsinapsis glutamatergica del NA, que subyacen al desarrollo de la adicción a la cocaína (Boudreau & Wolf, 2005; Kalivas & Volkow, 2005; Robinson et al., 2001; H. Shen et al., 2009). En un trabajo posterior, Toda y col (Toda et al., 2010) vincularon la disrupción del citoesqueleto de actina con los cambios morfológicos de las espinas dendríticas y la respuesta conductual sensibilizada a cocaína en el NA core, sugiriendo que la expresión de la sensibilización conductual a cocaína involucra la reorganización de F-actina en las espinas dendríticas inducida por la cocaína (Toda et al., 2010).

De manera similar a lo descrito en respuesta a la administración de cocaína, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la exposición a estrés crónico induce cambios duraderos en la dinámica de actina a través de alteraciones en los niveles de expresión y fosforilación de ABPs. Específicamente, Esparza y col (Esparza et al., 2012) reportaron que la exposición a estrés crónico por inmovilización disminuye los niveles de expresión de p-cofilina y F-actina en el NA core de animales estresados 21 días después del estresor. En este sentido, cofilina puede incrementar el remodelado del citoesqueleto al unirse a la actina y esta acción puede ser inhibida por fosforilación (Bamburg, 1999), por lo que, la disminución de p-cofilina podría reflejar el incremento de la actividad de cofilina en su estado activo, sugiriendo que la disminución de p-cofilina podría estar involucrada en un incremento en el recambio de actina en respuesta a estrés a largo plazo. Sin embargo, la participación de cofilina no fue evaluada en este trabajo. Por otra parte, la proteína cofilina puede incrementar el “pool” de G-actina acelerando el ensamblaje de actina, a través de factores que promueven la polimerización y la nucleación de actina a partir de fragmentos de F-actina (Bamburg, 1999; Kruijssen & Wierenga, 2019). En este sentido, luego de la administración de cocaína se observaron niveles reducidos de p-cofilina y p-cortactina en el NA core de animales estresados, sin cambios en los niveles de F-actina, lo cual, llevó a sugerir un incremento de la nucleación y la polimerización de actina en estructuras ramificadas a través del incremento de la cortactina activada y la activación del complejo Arp2/3 (Lua & Low, 2005). En síntesis, a partir de este trabajo, Esparza y col (Esparza et al., 2012) establecieron que la exposición a estrés o cocaína inducen alteraciones en las ABPs de manera diferencial, ya que en animales estresados se observó una reducción de la expresión de p-cofilina, mientras que

---

en animales previamente estresados, que recibieron una inyección de cocaína, se observó una reducción de p-cofilina y p-cortactina. Esto sugiere modificaciones diferenciales en el patrón de expresión de ABPs después de la inyección aguda de la droga. La relevancia de este trabajo radica en la relación que se estableció entre el recambio de actina (asociado a las modificaciones de ABPs previamente descrito) y la sensibilización a cocaína inducida por estrés. En particular, se demostró que la disrupción de la dinámica de actina mediante Latrunculina A en el NA core de animales estresados previno la expresión de la sensibilización conductual inducida por estrés, sugiriendo por un lado, que la expresión de la sensibilización cruzada a cocaína inducida por estrés depende del remodelado de actina en el NA core, y que la exposición a estrés repetido es capaz de alterar la capacidad de una subsecuente inyección de cocaína para modular los cambios en la dinámica de actina, a través de la modificación de ABPs, como p-cofilina (Esparza et al., 2012).

A partir de estos antecedentes en el presente trabajo, hipotetizamos que la desregulación en la actividad de cofilina inducida por la exposición a estrés es crítica en la vulnerabilidad al consumo de cocaína y evaluamos su participación en la expresión de la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína, así como también, durante la adquisición de la conducta de AA de cocaína inducida por estrés. Los resultados obtenidos demuestran que la exposición a estrés crónico modula la actividad de cofilina en el NA core y esto es necesario para la expresión de la sensibilización conductual inducida por estrés, así como también, durante la adquisición de la conducta de AA de cocaína. Específicamente, el tratamiento con el RNA de interferencia de cofilina luego de la exposición a estrés disminuye los niveles de expresión de cofilina en NA core, promoviendo la estabilización de la dinámica de actina luego del estrés, asociado al incremento del ratio p-cofilina/cofilina, y este cambio en la estabilización de la actina mediado por cofilina es suficiente para prevenir la expresión de la sensibilización conductual a cocaína, tres semanas después de la última exposición a estrés. Es decir, nuestros resultados sugieren que el estrés crónico modula el recambio de actina a largo plazo en el NA core a través de cofilina y esta modulación parece ser necesaria para la expresión de la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína. Apoyando estas observaciones, la participación de cofilina en respuesta a estrés fue descrita en otras áreas neuronales como el hipocampo, en donde se reportó que el estrés induce modificaciones en la plasticidad estructural a través de la disminución de p-cofilina (Y. Chen et al., 2008) y el incremento de p-cofilina en las espinas dendríticas del hipocampo

se vinculó con la estabilización del LTP (L. Y. Chen et al., 2007), resaltando la importancia de cofilina en la plasticidad sináptica inducida por estrés en un área íntimamente asociadas al aprendizaje y la memoria. Sin embargo, hasta el día de la fecha existen pocos estudios que demuestren directamente el rol funcional de cofilina en respuesta a estímulos estresantes en el NA, ya que, la mayor parte de las evidencias demuestran el papel clave de las vías de señalización aguas arriba de cofilina en los cambios plásticos inducidos por el estrés en modelos de roedores de depresión y trastornos por estrés en otras áreas neuronales (Fan et al., 2018; Fox et al., 2020; Gao et al., 2020; S. A. Golden et al., 2013; Y. Lu et al., 2019; Qiao et al., 2016). Por ejemplo, se reportó que cofilina y sus efectores ascendentes Rac1 y LIMK1 parecen estar implicados en la plasticidad sináptica inducida por diferentes paradigmas de estrés crónico en el NA (S. A. Golden et al., 2013), corteza prefrontal ventro-medial (CPfvm) (Fan et al., 2018), hipocampo (Y. Chen et al., 2008; Y. Lu et al., 2019) y corteza media prefrontal (CPfm) (Gao et al., 2020). Además, en nuestro trabajo pudimos establecer la participación de cofilina en la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducida por estrés. Específicamente estos resultados demuestran que el incremento en la estabilización de la dinámica de actina inducida por la disminución en los niveles de expresión de cofilina en el NA core previene la facilitación de la adquisición de la conducta de AA de cocaína inducida por estrés y esta respuesta es específica para cocaína, ya que, el tratamiento del RNA de interferencia de cofilina en el NA core de los animales estresados y no estresados, no afectó la adquisición de la conducta de AA ante un reforzador natural, como la sacarosa. De esta manera, estos resultados demuestran que el estrés crónico a largo plazo induce alteraciones en la dinámica de actina en el NA core, a través de la modulación de la actividad de cofilina, y estos cambios en la dinámica de actina mediados por cofilina incrementan la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducido por estrés.

---

## **2. PARTICIPACION DE COFILINA EN LA REGULACIÓN DE LOS CAMBIOS PLÁSTICOS ESTRUCTURALES Y EN LAS ALTERACIONES EN LA POSTSINAPSIS GLUTAMATÉRGICAS INDUCIDOS POR ESTRÉS CRÓNICO, LUEGO DE LA COCAÍNA EN EL NA CORE**

### **2.1 Sensibilización cruzada entre estrés y cocaína: Participación de cofilina en la expresión de receptores AMPA en el NA core.**

Las MSNs del NA reciben aferencias glutamatérgicas de regiones límbicas y corticales, como la amígdala, el hipocampo y la CPf, las cuales están asociadas con la transmisión de la información relacionada con eventos motivacionalmente relevantes, la asociación con el contexto y la consecuente integración de la información para dar una respuesta conductual (Kalivas & O'Brien, 2008). Una característica interesante observada en modelos animales de adicción es que las respuestas conductuales a la cocaína y las señales asociadas a la droga se fortalecen en animales con un historial de experiencia previa con la cocaína (Bobadilla et al., 2017). En este sentido, la liberación de Glu aumenta en el NA de animales sensibilizados a la cocaína en respuesta a una administración desafío de la droga (Pierce et al., 1996), así como también, después de la presentación de una señal emparejada con la administración no-contingente de la cocaína (Hotsenpiller et al., 2001). En esta línea, se demostró que luego de un periodo de abstinencia se produce un incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie en el NA de animales que estuvieron expuestos previamente a la droga. Además, la expresión de la sensibilización psicomotora a cocaína se vinculó con el incremento en la expresión de receptores AMPA en el NA de animales pre-tratados con dosis repetidas de cocaína, y la magnitud de la sensibilización se correlacionó con la cantidad de receptores expresados en la superficie de las MSNs luego de la re-exposición a la droga (Boudreau & Wolf, 2005; Ferrario et al., 2010; M. E. Wolf & Ferrario, 2010). De esta manera, se propone que el incremento en la transmisión glutamatérgica en el NA desencadenado por la experiencia previa con la droga es necesario para las alteraciones conductuales a largo plazo que acompañan a la adicción a la cocaína y estas adaptaciones en la transmisión glutamatérgica serían las responsables de los cambios en la plasticidad de NA inducido por la droga a largo plazo (Bobadilla et al., 2017).

A nivel postsináptico, el tráfico de receptores de glutamato tipo AMPA dentro y fuera de la sinapsis es un mecanismo importante que regula la fuerza sináptica de varios tipos de plasticidad, incluido el LTP (Bredt & Nicoll, 2003; Malinow & Malenka, 2002;

---

Turrigiano & Nelson, 2004). El aumento de la fuerza sináptica subyacente a la inducción del LTP, está favorecido por un cambio en el tráfico de receptores AMPA que se traduce en un mayor número de receptores AMPA en la membrana postsináptica (Malenka & Bear, 2004; Malenka & Nicoll, 1999), y por cambios estructurales que involucran el aumento de las espinas directamente asociado a el incremento en el tamaño de la cabeza de las espinas. Estos cambios funcionales y estructurales además, que se encuentran acompañados por el aumento en el tamaño de la PSD durante el LTP (Lau & Zukin, 2007; Malenka & Bear, 2004; Matsuzaki et al., 2004).

La dinámica de actina regula los cambios estructurales en las espinas dendríticas durante la plasticidad neuronal (Berry & Nedivi, 2017; Caroni et al., 2012), y el incremento de la dinámica de actina luego de las experiencias se cree que apoya los cambios a largo plazo durante la plasticidad dependiente de la experiencia (A. Holtmaat & Svoboda, 2009). El crecimiento de las espinas involucra el remodelado de la actina, la cual se encuentra altamente enriquecida en las espinas dendríticas. En este sentido, la estimulación de una espina incrementa la polimerización de actina en la cabeza de la espina, lo cual conduce en una mayor presencia de actina filamentosa (F-actina) y en una espina de mayor tamaño (Matsuzaki et al., 2004; Nakahata & Yasuda, 2018). Estos cambios morfológicos durante la inducción del LTP (polimerización de actina y crecimiento de las espinas) y funcionales (incremento de receptores AMPA en la sinapsis) se encuentran íntimamente relacionados y pueden ser regulados por múltiples mediadores moleculares (Kruijssen & Wierenga, 2019), que actúan como interruptores entre los estímulos y la reorganización necesaria del citoesqueleto de actina para la plasticidad sináptica.

En este trabajo, caracterizamos la participación de cofilina en las adaptaciones ocurridas en la postsinapsis glutamatérgicas durante la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés. Antecedentes de nuestro laboratorio demostraron la participación de la transmisión glutamatérgica en la sensibilización conductual a cocaína inducida por la exposición a estrés agudo o crónico y el vínculo entre la disrupción de la dinámica de actina en el NA core y la expresión de la sensibilización a cocaína inducida por estrés (Esparza et al., 2012; Garcia-Keller et al., 2013; Pacchioni et al., 2007). Estos trabajos establecieron que la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés, involucra el incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie GluR1 en el NA core de animales

---

estresados, y que la infusión local de CNQX un antagonista de receptores AMPA, en el NA core, previene la expresión de la sensibilización, estableciendo una asociación entre la expresión de receptores AMPA y la respuesta conductual incrementada que caracteriza la expresión de la sensibilización neuronal (Garcia-Keller et al., 2013), y poniendo en evidencia que las adaptaciones en la transmisión glutamatérgica descritas en respuesta a la administración de cocaína también ocurren en un modelo de sensibilización cruzada entre estrés y cocaína y participan en la expresión de la sensibilización psicomotora. Asimismo, en el trabajo de Esparza y col (Esparza et al., 2012) los autores demostraron que la infusión de Latrunculina A en el NA core de animales sensibilizados pre-expuestos a estrés crónico, previene el incremento en la respuesta conductual luego de una dosis desafío de cocaína, así como también, previene el incremento en la expresión de receptores AMPA GluR1 de superficie en el NA core, estableciendo una relación entre la disrupción del citoesqueleto de actina, la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés y el tráfico de receptores AMPA en la sinapsis del NA core durante la sensibilización, pero no se investigó el rol preciso de cofilina en el tráfico de receptores AMPA, aunque los autores observaron que los niveles fosforilados de esta proteína estaban alterados luego del estrés y la cocaína (Esparza et al., 2012).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la inhibición de cofilina en NA core, es suficiente para prevenir el incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie en ratas estresadas crónicamente, 45 min después de la exposición a cocaína. Estos resultados, se correlacionan con la capacidad del RNA de interferencia de cofilina de prevenir la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por la previa exposición a estrés. De esta manera, sugieren que las adaptaciones en la postsinapsis glutamatérgicas del NA core y la expresión de la sensibilización conductual inducidas por estrés están directamente vinculados con los cambios en la estricta regulación de cofilina inducido por estrés, frente a una dosis desafío de cocaína, ya que, el incremento en la estabilización de la dinámica de actina luego del estrés regulado por cofilina fue crítico para que ambos eventos sucedan. En conjunto, estos resultados plantean la posibilidad de que cofilina actúe como un mediador molecular común entre el estrés y la cocaína, necesario para inducir el recambio de actina y las neuroadaptaciones a largo plazo en el NA core que impactan en el comportamiento. Apoyando esta interpretación, algunos autores proponen que el estrés puede incrementar la sensibilidad a las propiedades reforzantes de las drogas



a través de cambios en el circuito de recompensa del cerebro y en particular a través del incremento en la transmisión glutamatérgica en el NA, y en consecuencia aumentar la motivación para consumir drogas de manera compulsiva (Boden et al., 2012; Sinha, 2001, 2008). En el NA shell se describió que el estrés por nado forzado incrementa el ratio AMPA/NMDA lo que sugiere un fortalecimiento general de la sinapsis (Campioni et al., 2009) y del mismo modo, el estrés por derrota social induce un cambio en el perfil de expresión de subunidades de receptores AMPA en animales susceptibles, aumentando la expresión de GluR1 y disminuyendo la de GluR2, lo cual está asociado con una mayor excitabilidad de las MSNs (Vialou et al., 2010). Sin embargo, no está claro el mecanismo molecular por el cual el estrés incrementa el recambio de actina y la expresión de receptores AMPA en las sinapsis del NA. Estudios de otros laboratorios demostraron que cofilina controla la expresión de superficie de los receptores AMPA a través de un mecanismo dependiente de actina, y regula la fuerza sináptica a través de la movilidad de los receptores AMPA en la sinapsis (Bosch et al., 2014; Rust et al., 2010). Durante la inducción del LTP se reportó que el incremento en la actividad de cofilina es necesario para el crecimiento inicial de la espina y la acumulación sináptica de receptores AMPA GluR1, mientras que la consolidación de los cambios depende de la inactivación de cofilina y el incremento de p-cofilina (Gu et al., 2010; Noguchi et al., 2016; Stefen et al., 2016). En este sentido, mediante estudios de alta resolución Rust y col (Rust et al., 2010) reportaron que la delección de cofilina en el proencéfalo de ratones, incrementa los niveles de F-actina en la sinapsis, y este incremento en la estabilización de la actina disminuye significativamente la movilidad de receptores AMPA en la sinapsis, lo cual sugirió que la interacción directa de una densa red de actina con los complejos de receptores limita la difusión de proteínas integrales de membrana (Coleman et al., 2003; L. Shen et al., 2000). Sin embargo, el efecto fue específico para los receptores, ya que la movilidad de las balsas lipídicas (plataformas formadas por glicolípidos y esfingomiélinas en la membrana plasmática necesarias para la interacción de las proteínas implicadas en el transporte vesicular) en la membrana no se vio alterada. De esta manera, las observaciones de este trabajo, en conjunto con los antecedentes previos de nuestro laboratorio demuestran que la exposición a estrés crónico incrementa el recambio de actina a largo plazo en NA core, a través de la regulación de la actividad de cofilina, ya que, la estabilización de la dinámica de actina en el NA core luego del estrés inducida por el tratamiento con shcofilina previene las adaptaciones postsinápticas en la transmisión glutamatérgica

---

inducidas por la cocaína (incremento en la expresión de GluR1) y el incremento en la respuesta conductual durante la expresión de la sensibilización, revelando que la modulación de la actividad de cofilina mediada por estrés es clave para las neuroadaptaciones desencadenadas por una subsecuente inyección de cocaína en el NA core.

## **2.2 Sensibilización cruzada entre estrés y cocaína: Participación de cofilina en los cambios estructurales asociados a la potenciación sináptica en el NA core**

Se ha observado que el remodelado de actina se incrementa en respuesta a diferentes experiencias, lo cual, en parte, se encuentra involucrado con los cambios a largo plazo en los circuitos neuronales durante la plasticidad dependiente de las experiencias (Hofer et al., 2009; A. Holtmaat & Svoboda, 2009). Durante la reinstalación inducida por cocaína o por señales asociadas a la administración de la droga, se describió que se produce un derrame de Glu en las sinapsis del NA en paralelo con una potenciación sináptica transiente (t-PS en inglés “*transient synaptic potentiation*”) de las MSNs dentro de los primeros 15 min luego de la exposición a la droga (Gipson, Kupchik, et al., 2013). Esta potenciación sináptica transitoria luego de la cocaína o claves asociadas con la droga, está asociada al incremento en el tamaño de las cabezas de las espinas dendríticas en el NA y al aumento en el radio AMPA/NMDA (Bobadilla et al., 2017), y dichos parámetros pueden ser utilizados como un índice representativo de la fuerza sináptica, asociada al incremento de receptores AMPA en la sinapsis del NA (Bobadilla et al., 2017). Además, se reportó que la exposición a claves asociadas a la administración de cocaína en animales, que previamente fueron expuestos a un paradigma de AA de cocaína crónica, induce rápidamente un incremento en el tamaño de las cabezas de las espinas dendríticas en NA core acompañado de un aumento en la expresión de superficie de GluR1, sugiriendo que estos cambios estructurales y funcionales son puntos claves asociados con las alteraciones conductuales a largo plazo en la adicción (Anderson et al., 2008; Gipson, Kupchik, et al., 2013). En este sentido, se propuso que la cocaína a través del desarrollo de una t-SP recluta una mayor red neuronal de MSNs en respuesta a la recompensa de la droga, incrementando la red neuronal que codifica las señales luego de largos periodos libres de droga (Bobadilla et al., 2017; Cameron & Carelli, 2012; Carelli et al., 2000; Gipson, Kupchik, et al., 2013; Koya et al., 2009).

A partir de estos antecedentes, en este trabajo de tesis evaluamos la participación de cofilina en los cambios estructurales inducidos por estrés en el NA core luego de la administración de cocaína y su asociación con la sensibilización conductual. Con estos resultados pudimos determinar que la cocaína incrementa el diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas en el NA core de animales estresados, fenómeno que fue correlacionado positivamente con el incremento de la actividad locomotora observada en estos animales estresados luego de la cocaína, lo cual sugiere una asociación causal entre el incremento en el diámetro de la cabeza de las espinas y la expresión sensibilización conductual. Consistentemente con estas observaciones, Shen y col (H. Shen et al., 2009) reportaron que la re exposición a cocaína de animales previamente sensibilizados, incrementa el tamaño de la cabeza de las espinas en el NA 45 min después de la administración de la droga, sin cambios en la densidad total de espinas presentes en las MSNs (H. Shen et al., 2009). De la misma manera, la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés involucra el incremento en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas en el NA core, y este cambio estructural inducido por la cocaína en animales estresados podría estar correlacionado con el incremento en la expresión de receptores AMPA previamente observado durante la expresión de la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína. Además, nuestros resultados tienen relación con el incremento en el diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas y el radio AMPA/NMDA descrito luego de un periodo de abstinencia de cocaína (Gipson, Reissner, et al., 2013; Kalivas, 2009; M. E. Wolf & Ferrario, 2010), sugiriendo que la pre exposición a estrés puede desencadenar adaptaciones postsinápticas a largo plazo en el NA core, similares a las adaptaciones descritas luego de un tratamiento repetido con cocaína y su re exposición.

Además, en este trabajo describimos que la exposición a estrés crónico por inmovilización provocó una leve reducción en el diámetro de las cabezas de las espinas en el NA core (que se incrementa luego de la cocaína), posiblemente asociado a los bajos niveles de expresión de p-cofilina y F-actina y el incremento en el recambio de actina luego del estrés descrito por Esparza (Esparza et al., 2012). Sin embargo, estudios previos reportaron que la exposición a estrés agudo de inmovilización no altera el diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas en el NA core tres semanas después del estresor (Garcia-Keller et al., 2016), aunque probablemente estas diferencias estén asociadas a las diferencias en el esquema de estrés como son la duración de exposición al

---

estresor, las técnicas utilizadas para las determinaciones y el tiempo en el cual se evalúa el cambio estructural. Asimismo, el cambio estructural inducido por la cocaína en el diámetro de las cabezas de las espinas del NA luego del estrés, respalda la capacidad de cocaína de modificar el patrón de expresión de ABPs luego del estrés, a través de la disminución de p-cofilina y p-cortactina y la posible participación del complejo Arp2/3 (H. Shen et al., 2009) incrementando la nucleación de ramificaciones de actina en la cabeza de las espinas y en consecuencia incrementando el tamaño de la cabeza de las espinas, descrito previamente por Esparza (Esparza et al., 2012).

Una de las hipótesis de este trabajo es que cofilina es un mecanismo molecular por el cual se produce la expansión de las espinas dendríticas en el NA core durante la expresión de la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína, responsable de los cambios duraderos en las MSNs del NA. Tras la inducción de la LTP, el tamaño de la cabeza de las espinas se incrementa, y esta modificación es mediada por un incremento de actina y proteínas que interactúan con la actina para permitir el remodelado del citoesqueleto. Se ha descrito que los niveles de la proteína cofilina se incrementan durante el pico de crecimiento máximo de las espinas y se mantienen elevados en las cabezas de las espinas durante al menos 30 min, para ser luego fosforilada por su regulador aguas arriba LIMK1 (Bosch et al., 2014), lo cual permitiría la consolidación de los cambios estructurales (Noguchi et al., 2016). En este trabajo de tesis demostramos que los bajos niveles de expresión de cofilina en NA core inducidos por el tratamiento previo con el RNA de interferencia de cofilina disminuyen el diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas en los animales previamente expuestos a estrés, y la administración de cocaína no es capaz de provocar una modificación (o incremento) en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas, evento que fue observado en respuesta a cocaína en animales estresados tratados con el lentivirus control en NA core. Además, el tratamiento con shcofilina previno la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés y la disminución en el diámetro de la cabeza de las espinas se correlacionó con la disminución de la actividad locomotora observada en estos animales estresados luego de la cocaína, estableciendo una asociación causal entre la disminución en el diámetro de la cabeza de las espinas y la inhibición de la expresión sensibilización conductual mediada por los bajos niveles de expresión de cofilina en el NA core. De esta manera, este resultado destaca la importancia del papel de cofilina en el mantenimiento de la plasticidad estructural durante la expresión de la sensibilización cruzada entre el estrés y la cocaína.

Consistentemente, un trabajo reciente reportó que la búsqueda de cocaína inducida por claves asociadas a la administración de la droga involucra el incremento en el tamaño de la cabeza de las espinas dendrítica en el NA a través del incremento en los niveles p-cofilina en el NA (Garcia-Keller et al., 2020). Además, el crecimiento de las espinas está fuertemente correlacionado con cambios en fuerza de la sinapsis (Noguchi et al., 2011), la expresión de receptores AMPA y el incremento de la PSD durante la inducción del LTP, por lo cual, se podría proponer que espinas más grandes pueden expresar mayor cantidad de receptores (Bosch et al., 2014). En este trabajo, la disminución observada en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas luego de la cocaína, inducida por bajos niveles de expresión de cofilina en las MSNs del NA core, podría estar directamente relacionado con la capacidad del shcofilina de prevenir la expresión de receptores AMPA de superficie luego de la cocaína en animales estresado durante la expresión de la sensibilización conductual. Por lo tanto, la estabilización de la actina inducida por los bajos niveles de expresión de cofilina, luego del estrés, fue suficiente para prevenir los cambios estructurales y funcionales en las espinas dendríticas del NA core y la respuesta conductual sensibilizada desencadenadas por la administración de cocaína. Cabe destacar que en este trabajo no se realizaron estudios de electrofisiología las MSNs, pero las aproximaciones realizadas en este sentido, se realizaron de manera indirecta a través del cambio en el tamaño de la cabeza de las espinas y la expresión de receptores AMPA de superficie, dos de los tres parámetros utilizados para medir t-PS (Bobadilla et al., 2017).

### **2.3 Sensibilización cruzada entre estrés y cocaína: Participación de cofilina en las modificaciones de la densidad de espinas dendríticas de las MSNs del NA core**

El estrés crónico puede inducir alteraciones en la plasticidad estructural y sináptica del circuito mesocorticolímbico, lo cual tiene un impacto en la transmisión glutamatérgicas del NA (S. M. Brown et al., 2005; H. Shen et al., 2009; Toda et al., 2006). Antecedentes de nuestro laboratorio establecieron una estrecha relación entre los cambios a largo plazo inducidos por una única exposición a estrés en las sinapsis glutamatérgicas de NA y su impacto en la facilitación de la AA de cocaína. Particularmente, se reportó que la exposición a estrés agudo por inmovilización facilita la adquisición de la AA de cocaína y una única exposición a estrés puede incrementar la densidad de espinas dendríticas, así como, las corrientes glutamatérgicas AMPA/NMDA en NA core, 21 días

---

después del estresor, similar a los cambios observados luego de un periodo de abstinencia de cocaína (Kalivas, 2009; M. E. Wolf, 2010), apoyando la idea de la existencia de sustratos comunes entre el estrés y cocaína (Garcia-Keller et al., 2016), que incrementan la vulnerabilidad a desarrollar adicción.

En este trabajo reportamos que no se producen modificaciones en la densidad total de espinas en el NA core, así como tampoco encontramos diferencias en las densidades de espinas individuales (*thin*, *mushroom* y *stubby*) 24 h después de la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés. Sin embargo, reportamos una interacción de tres factores (estrés crónico, shcofilina y cocaína) en la densidad de espinas *mushroom* al tiempo medido. En este sentido, es aceptado que las espinas *mushroom* albergan sinapsis más grandes y más fuertes, y son responsables del mantenimiento de las redes neuronales y la memoria a largo plazo (Bourne & Harris, 2008). Aunque en este trabajo no describimos cambios en la densidad de espinas maduras, las observaciones descritas previamente, relevaron que el incremento en la estabilización de la dinámica de actina inducida por los bajos niveles de expresión de cofilina en el NA core de animales estresados fue suficiente para prevenir la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés. Este cambio comportamental fue correlacionado con la capacidad de shcofilina para prevenir el incremento en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas luego de la cocaína, y el incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie en el NA core de animales estresados. De esta manera, la interacción observada en esta población de espinas maduras podría indicar que la modulación de cofilina inducida por estrés crónico en el remodelado y la densidad de las espinas tipo *mushroom* es crítica durante la sensibilización a cocaína. Apoyando esta idea, Esparza y col (Esparza et al., 2012) reportaron que durante la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés se produce un incremento en la PSD y en la expresión de receptores AMPA de superficie en el NA core de animales expuestos a estrés y cocaína. Asimismo, los autores reportaron que no se producen cambios en la densidad total de espinas presentes en el NA core, lo cual, posiblemente esté asociado a una mayor población de espinas maduras durante la expresión de la sensibilización (Esparza et al., 2012), vinculado a una reorganización estructural de las conexiones del NA. Sin embargo, el incremento de espinas tipo *mushroom* no fue demostrado en ese trabajo. En esta línea, considerando el rol del estrés, Christofell y col (Christoffel, Golden, Dumitriu, et al., 2011) reportaron que el estrés por derrota social aumenta la formación de espinas

*mushroom* en las MSNs y la frecuencia de mEPSC, y así como también, incrementa el radio AMPA/NMDA, y la expresión de receptores AMPA GluR1 en el NA shell, sugiriendo que el estrés aumenta la excitabilidad de las MSNs e induce el fortalecimiento de las sinapsis en el NA (Campioni et al., 2009; Vialou et al., 2010). De esta manera, los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis del desarrollo de una potenciación sináptica durante la expresión de la sensibilización cruzada entre el estrés y la cocaína en el NA core (asociada al incremento en el diámetro de las cabezas de las espinas dendríticas y la expresión de receptores AMPA en animales estresados luego de la cocaína), la cual fue prevenida por el incremento en la estabilización de la dinámica de actina inducida por los bajos niveles de expresión de cofilina en el NA core de animales estresados y expuestos a una dosis desafío de cocaína, y sugieren que la población de espinas *mushroom* es crítica para el desarrollo de la potenciación sináptica que acompaña la expresión de la sensibilización conductual. Además, dada la relevancia funcional y estructural de cofilina en las espinas dendríticas (Kruijssen & Wierenga, 2019), estos resultados podrían señalar la importancia del remodelado de actina en las espinas dendríticas maduras mediado por cofilina durante la respuesta sensibilizada a cocaína inducida por estrés crónico. Cabe mencionar que, en respuesta a la administración de cocaína se reportó que, durante la abstinencia prolongada, se produce una potenciación sináptica persistente en el NA, acompañada por el incremento en el radio AMPA/NMDA, que se correlaciona con las observaciones descritas por Wolf y col (Boudreau & Wolf, 2005; M. E. Wolf & Ferrario, 2010), quienes establecieron un incremento en la expresión de receptores AMPA en la postsinapsis durante la abstinencia a cocaína. Sin embargo, durante la abstinencia temprana se observó una disminución en el radio AMPA/NMDA, demostrando que la potenciación sináptica se desarrolla con el tiempo. Mientras que, la re exposición de los animales a la cocaína durante la abstinencia prolongada desencadena una disminución en el radio AMPA/NMDA, similar a lo descrito durante la abstinencia temprana a la cocaína (Kourrich et al., 2007). En la misma línea, Khibnik y col (Khibnik et al., 2016) reportaron que la cocaína disminuye la fuerza sináptica en las espinas tipo *mushroom* de la población D<sub>1</sub>-MSNs, reflejado en la tendencia a la disminución en la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias unitarias (uEPSC). Estos hallazgos son consistentes con observaciones previas que describieron una disminución del radio AMPA/NMDA y en las mEPSC en D<sub>1</sub>-MSNs en respuesta a cocaína luego de un periodo corto de abstinencia o abstinencia temprana (MacAskill et al., 2014; Pascoli et al., 2014;

Thomas et al., 2001), mientras que en la población espinas *mushroom* de las D<sub>2</sub>-MSNs reportaron que la cocaína induce una redistribución de la fuerza sináptica en las espinas *mushroom* (Khibnik et al., 2016). Por lo tanto, más estudios serán necesarios para determinar con precisión el rol de las espinas *mushroom* durante la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína.

Por otra parte, en este trabajo relacionamos la exposición a estrés y/o cocaína con las alteraciones en la densidad de espinas *thin* presentes en el NA core, 24 h después de la administración de la droga. Específicamente, demostramos una tendencia en aumento en la densidad de espinas *thin*, favorecida por la exposición a estrés crónico y la administración de cocaína, aunque estos resultados no fueron significativamente diferentes. Las espinas *thin* son estructuras altamente plásticas asociadas al aprendizaje, que pueden rápidamente cambiar de forma en respuesta a estímulos, incrementado su tamaño y reclutando receptores para contribuir a la potenciación sináptica o pueden contraerse en respuesta a una baja una frecuencia de estimulación (Kruijssen & Wierenga, 2019). Por lo cual, una interpretación posible de estos resultados es que el estrés y la cocaína incrementan la plasticidad del NA a través de modificaciones en la densidad de estas espinas inmaduras (Keck et al., 2008; G. Yang et al., 2009), aun cuando estos cambios no se vean reflejados en la densidad total de espinas, sugiriendo una reorganización estructural en el NA core durante la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés, consistente con los resultados obtenidos previamente por Esparza y col en nuestro laboratorio (Esparza et al., 2012). En relación a estas observaciones Dietz y col (Dietz et al., 2012) reportaron un incremento en la densidad de espinas inmaduras tipo *thin* en NA shell de animales sensibilizados luego del tratamiento crónico con cocaína, y este cambio se asoció a un mayor recambio de actina mediado por el aumento en la actividad de cofilina en el NA desencadenado por la cocaína, estableciendo un vínculo entre los cambios en la plasticidad estructural del NA mediados por cofilina y la respuesta conductual a cocaína. Sin embargo, Dimitriu y col (Dimitriu et al., 2012) reportaron que durante la abstinencia temprana a cocaína se produce una disminución en la densidad de espinas dendríticas en el NA core, a expensas de la pérdida de espinas tipo *thin*, y estos cambios persisten luego de 28 días de abstinencia. Mientras que en NA shell reportaron un incremento en la densidad de espinas, que retorna a niveles basales en tiempos prolongados de abstinencia (Dimitriu et al., 2012), otros datos que sugieren una clara diferencia entre los cambios estructurales desencadenados en los



subcompartimientos del NA inducidos por cocaína, posiblemente vinculados con el rol diferencial de cada subárea durante el desarrollo de adicción. Además, si bien, la activación de D<sub>1</sub>-MSNs y D<sub>2</sub>-MSNs contribuyen con los efectos gratificantes de la cocaína (Boyd & Mailman, 2012), y el aumento de la densidad de espinas dendríticas ocurre en las dos poblaciones de D<sub>1</sub>-MSNs y D<sub>2</sub>-MSNs tanto del NA core como en shell, las alteraciones a largo plazo solo persisten en la población de D<sub>1</sub>-MSNs luego de transcurrido 1 mes de la exposición a la droga (Lee et al., 2006), resultado que establece un rol predominante de las D<sub>1</sub>-MSNs en las alteraciones a largo plazo inducidas por la cocaína. Por otra parte, en respuesta a estrés, Christoffel y col (Christoffel, Golden, Dumitriu, et al., 2011) reportaron un incremento en la densidad de espinas inmaduras tipo *stubby* en el NA shell de animales susceptibles, lo cual permitió sugerir que el estrés, a través de la formación de nuevas espinas, incrementa el número de sinapsis glutamatérgicas funcionales (Christoffel, Golden, Dumitriu, et al., 2011), ya que espinas con PSD pequeñas pueden incrementar la frecuencia de las mEPSCs en NA. Además, en concordancia con estas observaciones, Golden y col (S. A. Golden et al., 2013) revelaron que la exposición a estrés por derrota social produce un incremento en espinas inmaduras tipo *stubby* en NA y el incremento de espinas *stubby* se vinculó con un incremento en la localización de cofilina en este tipo de espinas, sugiriendo la participación de cofilina de manera selectiva en el remodelado dendrítico inducido por la exposición a estrés. En esta línea, además, la diferenciación de los cambios ocurridos en las dos poblaciones de MSNs en respuesta a estrés, reveló que la exposición a estrés por derrota social causa atrofia dendrítica en la población D<sub>1</sub>-MSNs a través de la regulación de la RhoGTPasa RhoA y su efector descendente Rho-quinasa (ROCK) (Fox et al., 2018). Mientras que Fox y col (Fox et al., 2020) reportaron que la exposición a estrés por derrota social incrementa la densidad de espinas totales en el NA, asociado al incremento en la densidad de espinas inmaduras tipo *thin* y *stubby* en la población D<sub>2</sub>-MSNs y este cambio en la densidad de espinas inducido por estrés fue correlacionado con el desarrollo de la conducta de evasión social (Fox et al., 2020), sugiriendo que los ratones más susceptibles al estrés tienen una población mayor de espinas inmaduras en el NA, las cuales pueden madurar a espinas *mushroom* durante el estrés. Estos estudios concuerdan con otros antecedentes que muestran que la activación de las D<sub>1</sub>-MSNs induce resiliencia, mientras que la activación de la población de D<sub>2</sub>-MSNs promueve susceptibilidad al estrés (Francis et al., 2015) y otros reportes que describen un incremento en las mESPC reflejado en un aumento en el

---

número total de espinas en las D<sub>2</sub>-MSNs en ratones susceptibles al estrés (Christoffel, Golden, Dumitriu, et al., 2011; S. A. Golden et al., 2013). De esta manera, el estrés y la cocaína incrementan la densidad de espinas inmaduras en el NA, y los cambios en la densidad de espinas asociados a la exposición a estrés y/o cocaína podrían contribuir con las adaptaciones en la fuerza sináptica del NA, ya que espinas recién formadas sensibles a la estimulación del glutamato, pueden desencadenar adaptaciones en la fuerza sináptica en el NA que impactan en la transmisión sináptica (Khibnik et al., 2016). Por lo tanto, en este trabajo la densidad de espinas *thin* inducida por la exposición a estrés podría ser una neuroadaptación que contribuya con los cambios en la fuerza sináptica generados a largo plazo en respuesta a la administración de cocaína. Así, futuros estudios para determinar el rol de las D<sub>1</sub>-MSNs y D<sub>2</sub>-MSNs durante la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína. Además, Dietz y col (Dietz et al., 2012) y Golden y col (S. A. and Golden & Russo, 2012) reportaron la participación de cofilina en los cambios estructurales observados en la densidad de espinas inmaduras en el NA luego del estrés y la cocaína, si bien, los resultados de este trabajo no concuerdan con estas observaciones ya que la participación de cofilina solo se vio implicada en la densidad de espinas *mushroom*, y no en la densidad de espinas *thin* o *stubby*, estos trabajos respaldan la posibilidad de que la cofilina sea el mediador molecular intracelular responsable de modificar el citoesqueleto de actina en respuesta a estímulos estresantes.

En síntesis, estos resultados destacan la importancia de los cambios estructurales inducidos por el estrés en el NA y, proporcionan evidencia que sustenta la participación de cofilina en este proceso. Los bajos niveles de expresión de cofilina fueron suficientes para impedir el remodelado de actina necesario para que ocurran cambios rápidos en la morfología de las espinas dendríticas en respuesta a la cocaína y, por lo tanto, impidieron la expresión de la sensibilizada conductual. Además, a través de estos resultados demostramos la importancia del remodelado de actina modulado por cofilina en las espinas *mushroom*, ya que fue el único subtipo de espina en donde evidenciamos una interacción de tres factores (estrés, cocaína y shcofilina), sugiriendo que las espinas *mushroom* tiene un rol importante durante la expresión de la sensibilización conductual.

---

### 3. CARACTERIZACIÓN DE LA RHOGTPASA RAC1 EN LA SENSIBILIZACIÓN CRUZADA ENTRE ESTRÉS Y COCAÍNA Y EN LOS CAMBIOS PLÁSTICOS INDUCIDOS POR ESTRÉS EN LA POSTSINAPSIS GLUTAMATÉRTICAS DEL NA CORE

Numerosas vías de señalización aguas arriba de la cofilina regulan su actividad. En particular, la RhoGTPasa Rac1 está íntimamente involucrada en el remodelado dendrítico y la formación de nuevas espinas y constituye uno de los mecanismos más estudiados en la regulación de la actividad de cofilina, a través de la activación de los efectores cascada abajo PAK y LIMK1. Brevemente, el aumento en la actividad de la proteína Rac1 promueve la fosforilación de las proteínas PAK, LIMK1 y el incremento de p-cofilina, favoreciendo la polimerización de los filamentos de actina (Bamburg, 1999; Barbara W. Bernstein and James R. Bamburg, 2010; Borovac et al., 2018; Kruyer et al., 2019; Noguchi et al., 2016; Rust, 2015). Varios reportes previos vinculan la participación de la RhoGTPasa Rac1 en la plasticidad estructural y conductual desencadenada por la administración de cocaína. En este sentido, Dietz y col (Dietz et al., 2012) reportaron que la administración crónica de cocaína modula la dinámica de actina a través de la disminución de la actividad de Rac1 en NA shell, y este evento molecular origina el aumento de la actividad depolimerizante de cofilina favoreciendo el remodelado dendrítico en el NA, asociado a una mayor sensibilidad a los efectos de recompensa de la cocaína. Particularmente, observaron que la expresión de la mutante de Rac1 constitutiva activa (Rac-GTP) en NA shell bloquea los efectos de recompensa de cocaína en un modelo de condicionamiento de preferencia asociado a un lugar (CPP), así como también previene el incremento de la actividad locomotora luego de la administración de una dosis aguda de cocaína en animales previamente tratados con dosis repetidas de la droga. Mientras que la expresión de la mutante Rac1 dominante negativa (Rac-GDP) promueve el desarrollo de CPP a una dosis de cocaína menor a la cual se observó el condicionamiento en los animales controles, que no recibieron la microinyección de la proteína mutada en NA (Dietz et al., 2012), sugiriendo que la disminución en la actividad de Rac1 en el NA es necesaria para los efectos de recompensa de la cocaína y para la expresión de la sensibilización. En la misma línea, Li y col (J. Li et al., 2015) reportaron que el tratamiento crónico con cocaína incrementa la actividad de Rac1 en Caudado Putamen (Cpu), y la microinyección en el Cpu de un lentivirus capaz de inducir una

mutación en la proteína Rac1 que impide su activación previene el condicionamiento en un modelo de CPP, sugiriendo que el incremento en la actividad de Rac1 mediado por cocaína es necesario para el aprendizaje asociado a la recompensa de la droga (J. Li et al., 2015). Apoyando esta observación, Rac1 juega un papel importante en diversas formas de aprendizaje y memoria (Jiang et al., 2016) y en particular, en la consolidación de la memoria inducida por claves asociadas a la cocaína en el NA y en la reconsolidación de este tipo de memoria en la amígdala basolateral (Ding et al., 2013). Consistentemente con estos trabajos y, dado que la activación de la RhoGTPasa Rac1 está mediada por factores intercambiadores de nucleótidos guanina (GEFs), es importante mencionar que algunos GEFs fueron estudiados como blancos moleculares implicados en los mecanismos que median las respuestas a cocaína (Chandra et al., 2013; Dietz et al., 2012; Kiraly et al., 2010). En particular, animales knock-out de Kalirin7 en NA, uno de los GEFs de Rac1, mostraron una disminución en el condicionamiento en un modelo de CPP después de la cocaína, conjuntamente con una pérdida del incremento de la densidad de espinas dendríticas luego del tratamiento con la droga (Kiraly et al., 2010). Mientras que Chandra y col (Chandra et al., 2013) reportaron que tras la AA de cocaína los niveles de expresión de Tiam1, otro de los GEFs de Rac1, disminuyen en NA, similar a lo observado por Dietz (Dietz et al., 2012) tras la administración crónica no-contingente de la droga. Además la activación continua de las neuronas D<sub>1</sub>-MSNs en NA, no así las D<sub>2</sub>-MSNs, produjo una reducción en la expresión de Tiam1 similar a lo ocurrido luego de la AA de cocaína, y la inhibición selectiva de la activación de las neuronas D<sub>1</sub>-MSNs durante la exposición a cocaína bloqueó la sensibilización locomotora luego de la re exposición a la droga, sugiriendo la participación específica de Tiam1 como sustrato molecular en el comportamiento mediado por cocaína a través de la activación de las D<sub>1</sub>-MSNs de NA (Chandra et al., 2013). Estudios más recientes reportaron que la activación de receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en el NA modula diferencialmente la señalización inducida por Rac1 y Cdc42 en respuesta al consumo de metanfetamina (METH) (Tu et al., 2019; Zhao et al., 2019). La activación de ambos receptores en NA es necesaria para el condicionamiento en un modelo de CPP inducido por METH, así como también para inducir el incremento de actividad locomotora y generar los cambios plásticos en NA. Específicamente, la estimulación de receptores D<sub>1</sub> promueve la activación de las vías de señalización mediadas por Rac1 y Cdc42, mientras que la estimulación de receptores D<sub>2</sub> inhiben la activación de Rac1 pero activa Cdc42, y estos cambios moleculares estarían

implicados en el condicionamiento del CPP inducido por METH y en los cambios en la plasticidad estructural en NA, pero no en el incremento de la actividad locomotora (Tu et al., 2019). Además, Rac1 parece tener roles opuestos en la adquisición y extinción de memorias contextuales asociadas al consumo de METH en el NA y fue señalado como un posible blanco terapéutico para mitigar la recaída de su consumo a través de su señalización en D<sub>1</sub>-MSNs (Zhao et al., 2019). Precisamente, niveles reducidos de actividad de Rac1 son requeridos durante la adquisición de la memoria contextual asociada al consumo de METH y el remodelado dendrítico en NA, mientras que un incremento en su señalización es necesario durante la extinción de la memoria contextual. Asimismo, el incremento en la actividad de Rac1 solo está asociado a los cambios en plasticidad estructural de las D<sub>1</sub>-MSNs, pero no de las D<sub>2</sub>-MSNs (Zhao et al., 2019). En conjunto, las evidencias proponen que la administración de psicoestimulantes puede regular de manera diferencial la activación de Rac1 en el NA, un área íntimamente asociada a la conversión de un estímulo motivacionalmente relevante en una respuesta conductual (Klawonn & Malenka, 2018), así como también en Cpu, un área asociada a la formación de hábitos. Además, dentro de una misma área, como es el NA, la activación de las poblaciones D<sub>1</sub>-MSNs y D<sub>2</sub>-MSNs modulan la activación de Rac1 de manera diferencial para desencadenar una respuesta conductual, lo cual apoya la idea de que las RhoGTPasas actúan como mediadores moleculares en la interfaz entre el estímulo externo y la reorganización de actina en las espinas dendrítica necesaria para la comunicación entre las neuronas, permitiendo cambios adaptativos que median el comportamiento. De esta manera, la regulación diferencial de Rac1 en respuesta a la administración de cocaína parece ser necesaria para el desarrollo de las alteraciones conductuales que se desencadenan con el consumo repetido de la droga y los cambios a largo plazo en su actividad, inducidos por la cocaína, podrían ser los responsables de las neuroadaptaciones que subyacen al comportamiento adictivo.

En este trabajo, evaluamos la participación de Rac1 en la expresión de la sensibilización conductual a cocaína, y demostramos que la exposición a estrés crónico de inmovilización promueve la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés, a través de la disminución de la actividad de Rac1 en NA core. Específicamente, la sobreexpresión de la proteína Rac1 constitutiva activa (Rac1-GTP) en NA core luego del estrés, es suficiente para prevenir la expresión de la sensibilización cruzada a las propiedades estimulantes motoras de cocaína inducida por estrés crónico y

estos hallazgos se correlacionan con el incremento en la estabilización de la dinámica de actina en el NA core de animales estresados, similar a las observaciones previamente descritas luego del tratamiento con shcofilina en el NA core en animales estresados. Además, descartando una participación aleatoria de Rac1 en este fenómeno, la sobreexpresión de la proteína Rac1 dominante negativa (Rac1-GDP) no afecta la expresión de la sensibilización conductual inducida por estrés luego de la inyección no contingente de cocaína, así como tampoco provoca cambios en la dinámica de actina, evidenciado en el ratio de p-cofilina/cofilina luego del tratamiento con Rac1-GDP. En apoyo a estas observaciones, numerosos estudios reportaron la participación de Rac1 en los cambios plásticos y conductuales en respuesta a la exposición a estrés en modelos animales de depresión (Fan et al., 2018; S. A. Golden et al., 2013; Y. Lu et al., 2019). Interesantemente, luego de la exposición a estrés por derrota social, Golden y col (S. A. Golden et al., 2013) demostraron una disminución transcripcional de Rac1 48 h después del estresor en el NA, lo cual se refleja en la disminución de los niveles de expresión de la proteína total, y estos cambios moleculares fueron vinculados con cambios en la plasticidad estructural de las MSNs asociados con la conducta de evasión social y anhedonia (S. A. Golden et al., 2013). Asimismo, otros autores demostraron una disminución considerable en los niveles de expresión y fosforilación de LIMK1 y cofilina luego de la exposición a estrés crónico variable en corteza media prefrontal (CPfm) (Fan et al., 2018). Mientras que Lu y col (Y. Lu et al., 2019) vincularon los cambios en la plasticidad estructural en el hipocampo de ratones deprimidos con el incremento en la dinámica de actina, mediada por la disminución de la expresión de Rac1, LIMK1 y p-cofilina inducida por la exposición a estrés crónico variable (Y. Lu et al., 2019). De esta manera, se ha demostrado que la desregulación de la vía de señalización de Rac1 y su modulación sobre cofilina es un mecanismo molecular intracelular vinculado a la administración de cocaína y a la exposición a estrés, a través del cual, el estrés podría modificar el remodelado del citoesqueleto de actina necesario para desencadenar el incremento de los efectos gratificantes y reforzantes de la droga que impactan en el incremento de la vulnerabilidad al consumo de cocaína. Consistentemente, si bien, poco se sabe sobre la participación de Rac1 en el tráfico de receptores AMPA en respuesta a estímulos estresantes, dadas las similitudes observadas en el NA después del estrés o la administración de drogas de abuso (Miczek et al., 2008), resulta interesante especular acerca de su participación. En este sentido, observaciones previas reportaron un

incremento en los niveles de Kalirina7 (un GEFs de Rac1) en animales sensibilizados a la cocaína luego de un periodo de abstinencia, lo cual se vinculó con el incremento de la fracción activa de Rac1 y LIMK1 en el NA y el aumento de la fracción de superficie de GluR1 y la densidad de espinas dendríticas (Y. Wang et al., 2013). En este trabajo evaluamos la función de Rac1 en los cambios de la postsinapsis glutamatérgica durante la expresión de la sensibilización inducida por estrés. Nuestros resultados demostraron que la microinyección de Rac1 constitutiva activa (Rac1-GTP) es suficiente para prevenir el incremento en la expresión de receptores AMPA de superficie en ratas estresadas crónicamente 45 min después de la exposición a cocaína, así como también inhibe la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por la previa exposición a estrés. Estos resultados demuestran que el estrés induce la disminución en la actividad de Rac1 y esta regulación parece ser necesaria para la posterior respuesta frente a una dosis desafío de cocaína y las adaptaciones en la postsináptica glutamatérgicas del NA core. De esta manera, el estrés a través de la disminución en la actividad de Rac1 podría reducir el umbral necesario para que una subsecuente inyección de cocaína desencadene cambios en la plasticidad sináptica y conductual a largo plazo en el NA core, que contribuyen en el incremento de la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducida por estrés. Estudios futuros serán necesarios para establecer la participación de Rac1 en la morfología de las espinas dendríticas en respuesta a estímulos estresantes y su impacto en la vulnerabilidad a la adicción a cocaína.

## **CONCLUSIÓN**

El presente trabajo de tesis aporta evidencia de la participación de la vía de señalización de la RhoGTPasa Rac1 y la proteína cofilina en la modulación de las neuroadaptaciones ocurridas en NA core que contribuyen a la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína e impactan en la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducida por estrés crónico. En este estudio establecemos que algunos de los mecanismos neurobiológicos que modulan la administración repetida de cocaína influyen la sensibilización cruzada entre estrés y cocaína, y demostramos que el estrés crónico induce alteraciones a largo plazo en las espinas dendríticas del NA core a través de la desregulación en la señalización de la vía de Rac1 y cofilina.

En síntesis, las observaciones de este trabajo evidencian que el estrés crónico por inmovilización a través de la disminución de la actividad de la RhoGTPasa Rac1 y la modulación de la actividad de cofilina regula la reorganización del citoesqueleto de actina necesario para incrementar las propiedades estimulantes motoras de la cocaína y favorece el desarrollo de adaptaciones postsinápticas en la transmisión glutamatérgica del NA core que acompañan la expresión de la sensibilización conductual a cocaína inducida por estrés. Además, la regulación de la actividad de cofilina es clave en las neuroadaptaciones estructurales y funcionales a largo plazo desencadenadas por la exposición a estrés crónico, que contribuyen al aumento de la vulnerabilidad al consumo de cocaína inducida por estrés crónico. De esta manera, la vía de señalización de Rac1 y su regulación sobre cofilina constituiría un mecanismo molecular capaz de responder a estímulos estresantes, por el cual la cocaína desencadena alteraciones a largo plazo en la transmisión glutamatérgica que impactan en las alteraciones conductuales que acompañan a la adicción.



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Ahmed, S. H., & Koob, G. F. (1998). Transition from Moderate to Excessive Drug Intake: Change in Hedonic Set Point. *Science*, 282(October), 177-190.
- Alexander, B. K., Beyerstein, B. L., Hadaway, P. F., & Coombs, R. B. (1981). Effect of early and later colony housing on oral ingestion of morphine in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 15(4), 571-576.
- Allain, F., Bouayad-Gervais, K., & Samaha, A. N. (2018). High and escalating levels of cocaine intake are dissociable from subsequent incentive motivation for the drug in rats. *Psychopharmacology*, 235(1), 317-328.
- Allain, F., Minogianis, E. A., Roberts, D. C. S., & Samaha, A. N. (2015). How fast and how often: The pharmacokinetics of drug use are decisive in addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 56, 166-179.
- Allison, D. W., Gelfand, V. I., Spector, I., & Craig, A. M. (1998). Role of Actin in Anchoring Postsynaptic Receptors in Cultured Hippocampal Neurons: Differential Attachment of NMDA versus AMPA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 18(7), 2423-2436.
- Altman, J., Everitt, B. J., Glautier, S., Markou, A., Nutt, D., Oretti, R., Phillips, G. D., & Robbins, T. W. (1996). The biological, social and clinical bases of drug addiction: Commentary and debate. *Psychopharmacology*, 125(4), 285-345.
- Ambroggi, F., Turiault, M., Milet, A., Deroche-Gamonet, V., Parnaudeau, S., Balado, E., Barik, J., Van Der Veen, R., Maroteaux, G., Lemberger, T., Schütz, G., Lazar, M., Marinelli, M., Piazza, P. V., & Tronche, F. (2009). Stress and addiction: Glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking. *Nature Neuroscience*, 12(3), 247-249.
- Anderson, S. M., Famous, K. R., Sadri-Vakili, G., Kumaresan, V., Schmidt, H. D., Bass, C. E., Terwilliger, E. F., Cha, J. H. J., & Pierce, R. C. (2008). CaMKII: A biochemical bridge linking accumbens dopamine and glutamate systems in cocaine seeking. *Nature Neuroscience*, 11(3), 344-353.
- Andrianantoandro, E., & Pollard, T. D. (2006). Mechanism of Actin Filament Turnover by Severing and Nucleation at Different Concentrations of ADF/Cofilin. *Molecular Cell*, 24(1), 13-23.
- Antelman, S. M., Eichler, A. J., Black, C. A., & Kocan, D. (1980). Interchangeability of Stress and Amphetamine in Sensitization. *Science*, 207(August), 329-331.
- Antelman, S. M. (1988). Time-Dependent Sensitization As the Cornerstone for a New Approach to Pharmacotherapy: Drugs as Foreign/ Stressful Stimuli. *Drug Development Research*, 30, 1-30.
- Anthony, J. C., Warner, L. A., & Kessler, R. C. (1994). Comparative Epidemiology of Dependence on Tobacco, Alcohol, Controlled Substances, and Inhalants: Basic Findings From the National Comorbidity Survey. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 2(3), 244-268.
- Bäckström, P., & Hyttiä, P. (2007). Involvement of AMPA/kainate, NMDA, and mGlu5 receptors in the nucleus accumbens core in cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology*, 192(4), 571-580.
- Bagley, J., Moghaddam, B., & Haven, W. (1997). Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: Effects of pretreatment with saline or diazepam. *Neuroscience*, 77(1), 65-73.
- Bailey, C. H., Kandel, E. R., & Harris, K. M. (2015). Structural Components of Synaptic Plasticity and

- Memory Consolidation. *Cold Spring Harb Perspect in Biol*, 7, 1-29.
- Bamburg, J. R. (1999). PROTEINS OF THE ADF/COFILIN FAMILY: Essential Regulators of Actin Dynamics. *Cell Dev. Biol.*, 15, 185-230.
- Barbara W. Bernstein and James R. Bamburg. (2010). ADF/Cofilin: A Functional Node in Cell Biology. *Trends Cell Biol*, 23(1), 1-7.
- Belin, D., & Everitt, B. J. (2008). Cocaine Seeking Habits Depend upon Dopamine-Dependent Serial Connectivity Linking the Ventral with the Dorsal Striatum. *Neuron*, 57(3), 432-441.
- Bellenchi, G. C., Gurniak, C. B., Perlas, E., Middei, S., Ammassari-Teule, M., & Witke, W. (2007). N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes and Development*, 21(18), 2347-2357.
- Benwell, M. E. M., & Balfour, D. J. K. (1992). The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *British Journal of Pharmacology*, 105(4), 849-856.
- Berke, J. D., & Hyman, S. E. (2000). Addiction, Dopamine and the Molecular Mechanisms of Memory. *Neuron*, 25, 515-532.
- Bernard, O. (2007). Lim kinases, regulators of actin dynamics. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(6), 1071-1076.
- Bernstein, B. W., & Bamburg, J. R. (2010). ADF/Cofilin: A functional node in cell biology. *Trends in Cell Biology*, 20(4), 187-195.
- Berridge, K. C. (2004). Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology and Behavior*, 81(2), 179-209.
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1995). The Mind of an Addicted Brain: Neural Sensitization of Wanting Versus Liking. *Current Directions in Psychological Science*, 4(3), 71-75.
- Berridge, K. C., Venier, I. L., & Robinson, T. E. (1989). Taste Reactivity Analysis of 6-Hydroxydopamine-Induced Aphagia: Implications for Arousal and Anhedonia Hypotheses of Dopamine Function. *Behavioral Neuroscience*, 103(1), 36-45.
- Berry, K. P., & Nedivi, E. (2017). Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron*, 96(1), 43-55.
- Berton, O., & Nestler, E. J. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: Beyond monoamines. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(2), 137-151.
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamalas, M., Hervé, D., Valjent, E., & Girault, J. A. (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *Journal of Neuroscience*, 28(22), 5671-5685.
- Blanchoin, L., & Pollard, T. D. (1999). Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15538-15546.
- Blanpied, T. A., & Ehlers, M. D. (2004). Microanatomy of dendritic spines: Emerging principles of synaptic pathology in psychiatric and neurological disease. *Biological Psychiatry*, 55(12), 1121-1127.
- Bobodilla, A. C., Heinsbroek, J. A., Gipson, C. D., Griffin, W. C., Fowler, C. D., Kenny, P. J., & Kalivas, P. W. (2017). Corticostriatal plasticity, neuronal ensembles, and regulation of drug-seeking behavior. *En Progress in Brain Research* (1.<sup>a</sup> ed., Vol. 235). Elsevier B.V.
- 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 post-traumatic stress disorder symptomatology. *Addiction, 107*(3), 578-586.
- Boileau, I., Dagher, A., Leyton, M., Gunn, R., Baker, G. B., Diksic, M., & Benkelfat, C. (2006). Modeling Sensitization to Stimulants in Humans. *Archives of General Psychiatry, 63*, 1386-1395.
- Bonate, P. L., Swann, A., & Silverman, P. B. (1997). Context-dependent cross-sensitization between cocaine and amphetamine. *Life Sciences, 60*(1), 4-6.
- Borgland, S. L., Malenka, R. C., & Bonci, A. (2004). Acute and chronic cocaine-induced potentiation of synaptic strength in the ventral tegmental area: Electrophysiological and behavioral correlates in individual rats. *Journal of Neuroscience, 24*(34), 7482-7490.
- Borovac, J., Bosch, M., & Okamoto, K. (2018). Regulation of actin dynamics during structural plasticity of dendritic spines: Signaling messengers and actin-binding proteins. *Molecular and Cellular Neuroscience, 91*, 122-130.
- Bosch, M., Castro, J., Takeo, S., Hitomi, M., Mriganka, S., & Yasunori, H. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron, 82*(2), 444-459.
- Boudreau, A. C., Ferrario, C. R., Glucksmann, M. J., & Wolf, M. E. (2009). Signaling pathway adaptations and novel protein kinase A substrates related to behavioral sensitization to cocaine. *Journal of Neurochemistry, 110*, 363-377.
- Boudreau, A. C., & Wolf, M. E. (2005). Behavioral Sensitization to Cocaine Is Associated with Increased AMPA Receptor Surface Expression in the Nucleus Accumbens. *The Journal of Neuroscience, 25*(40), 9144-9151.
- Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience, 31*, 47-67.
- Boyd, K. N., & Mailman, R. B. (2012). Dopamine receptor signaling and current and future antipsychotic drugs. En *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 212, Número 212).
- Boyson, C. O., Unesp-araraquara, U., Quadros, I. M., Federal, U., Paulo, D. S., Paulo, S., & Miczek, K. A. (2012). *Prevention of social stress-escalated cocaine self-administration by CRF-R1 antagonist in the rat VTA. 218*(1), 257-269.
- Bozarth, M. A., Murray, A., & Wise, R. A. (1989). Influence of housing conditions on the acquisition of intravenous heroin and cocaine self-administration in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 33*(4), 903-907.
- Bradke, F., & Dotti, C. C. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science, 283*(5409), 1931-1934.
- Brady, K. T. (1997). Posttraumatic Stress Disorder and Comorbidity: Recognizing the Many Faces of PTSD. *Journal Clinical Psychiatry, 58*(suppl 9), 7-14.
- Brady, K. T., Dansky, B. S., Back, S. E., Foa, E. B., & Carroll, K. M. (2001). Exposure therapy in the treatment of PTSD among cocaine-dependent individuals: Description of procedures. *Journal of Substance Abuse Treatment, 21*(1), 35-45.
- Bramham, C. R. (2008). Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Current Opinion in Neurobiology, 18*(5), 524-531.
- Brebner, K., Wong, T. P., Liu, L., Liu, Y., Campsall, P., Gray, S., Phelps, L., Phillips, A. G., & Wang, Y.

- T. (2005). Neuroscience: Nucleus accumbens long-term depression and the expression of behavioral sensitization. *Science*, *310*(5752), 1340-1343.
- Bredt, D. S., & Nicoll, R. A. (2003). AMPA Receptor Trafficking at Excitatory Synapses. *Neuron*, *40*, 361-379.
- Brog, J. S., Ongse, A. S., Deutch, A. Y., & Zahm, D. S. (1993). The Patterns of Afferent Innervation of the Core and Shell in the “Accumbens” Part of the Rat Ventral Striatum: Immunohistochemical Detection of Retrogradely Transported Fluoro-Gold. *The Journal of comparative neurology*, *278*, 255-278.
- Browman, K. E., Badiani, A., & Robinson, T. E. (1998). The influence of environment on the induction of sensitization to the psychomotor activating effects of intravenous cocaine in rats is dose-dependent. *Psychopharmacology*, *137*(1), 90-98.
- Brown, S. A., Ph, D., Vik, P. W., Patterson, T. L., & Grant, I. (1995). Vulnerability and Adult Alcohol Relapse. *Journal of studies on alcohol*, *56*(5), 538-545.
- Brown, S. M., Henning, S., & Wellman, C. L. (2005). Mild, Short-term Stress Alters Dendritic Morphology in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, *15*(11), 1714–1722.
- Brown, T. E., Lee, B. R., Mu, P., Ferguson, D., Dietz, D., Ohnishi, Y. N., Lin, Y., Suska, A., Ishikawa, M., Huang, Y. H., Shen, H., Kalivas, P. W., Sorg, B. A., Suzanne Zukin, R., Nestler, E. J., Dong, Y., & Schlüter, O. M. (2011). A silent synapse-based mechanism for cocaine-induced locomotor sensitization. *The Journal of Neuroscience*, *31*(22), 8163-8174.
- Buzsáki, G. (2010). Neural Syntax: Cell Assemblies, Synapsesembles, and Readers. *Neuron*, *68*(3), 362-385.
- Cabib, S., Orsini, C., Le Moal, M., & Piazza, P. V. (2000). Abolition and reversal of strain differences in behavioral responses to drugs of abuse after a brief experience. *Science*, *289*(5478), 463-465.
- Calfa, G., Chapleau, C. A., Campbell, S., Inoue, T., J.Morse, S., 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*(1), 1493–1500.
- Calipari, E. S., Bagot, R. C., Purushothaman, I., Davidson, T. J., Yorgason, J. T., Peña, C. J., Walker, D. M., Pirpinias, S. T., Guise, K. G., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., & Nestler, E. J. (2016). In vivo imaging identifies temporal signature of D1 and D2 medium spiny neurons in cocaine reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(10), 2726-2731.
- Cameron, C. M., & Carelli, R. M. (2012). Cocaine abstinence alters nucleus accumbens firing dynamics during goal-directed behaviors for cocaine and sucrose. *European Journal of Neuroscience*, *35*(6), 940-951.
- Campioni, M. R., Xu, M., & McGehee, D. S. (2009). Stress-induced changes in nucleus accumbens glutamate synaptic plasticity. *Journal of Neurophysiology*, *101*(6), 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 Research Bulletin*, *40*(2), 105-110.
- Capani, F., Martone, M. E., Deerinck, T. J., & Ellisman, M. H. (2001). Selective localization of high concentrations of F-actin in subpopulations of dendritic spines in rat central nervous system: A three-dimensional electron microscopic study. *Journal of Comparative Neurology*, *435*(2), 156-170.

- Capriles, N., & Cancela, L. M. (1999). Effect of acute and chronic stress restraint on amphetamine-associated place preference: Involvement of dopamine D1 and D2 receptors. *European Journal of Pharmacology*, 386(2-3), 127-134.
- Carelli, R. M., Ijames, S. G., & Crumling, A. J. (2000). Evidence that separate neural circuits the nucleus accumbens encode cocaine versus «natural» (water and food) reward. *Journal of Neuroscience*, 20(11), 4255-4266.
- Caroni, P., Donato, F., & Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: Regulation and functions. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(7), 478-490.
- Carr, D. B., & Sesack, S. R. (2000). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, 20(10), 3864-3873.
- Carter, J. S., Kearns, A. M., Vollmer, K. M., Garcia-Keller, C., Weber, R. A., Baker, N. L., Kalivas, P. W., & Reichel, C. M. (2020). Long-term impact of acute restraint stress on heroin self-administration, reinstatement, and stress reactivity. *Psychopharmacology*, 237(6), 1709-1721.
- Chandra, R., Lenz, J., Gancarz, A. M., Chaudhury, D., Schroeder, G. L., Han, M. H., Cheer, J. F., Dietz, D. M., & Kay Lobo, M. (2013). Optogenetic inhibition of D1R containing nucleus accumbens neurons alters cocaine-mediated regulation of Tiam1. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 6(MAY), 1-8.
- Chang, F. L. F., & Greenough, W. T. (1984). Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Research*, 309(1), 35-46.
- Chen, L. Y., Rex, C. S., Casale, M. S., Gall, C. M., & Lynch, G. (2007). Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP. *Journal of Neuroscience*, 27(20), 5363-5372.
- Chen, Y., Bourne, J., Pieribone, V. A., & Fitzsimonds, R. M. (2004). The role of actin in the regulation of dendritic spine morphology and bidirectional synaptic plasticity. *NeuroReport*, 15(5), 829-832.
- Chen, Y., Dubé, C. M., Rice, C. J., & Baram, T. Z. (2008). Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin-releasing hormone. *Journal of Neuroscience*, 28(11), 2903-2911.
- Chicurel, M. E., & Harris, K. M. (1992). Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 325(2), 169-182.
- Cho, K. O., Hunt, C. A., & Kennedy, M. B. (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, 9(5), 929-942.
- 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). IκB kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. *Journal of Neuroscience*, 31(1), 314-321.
- Christoffel, D. J., Golden, S. A., & Russo, S. J. (2011). Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders. *Reviews in the Neurosciences*, 22(5), 535-549.
- Christopher A. Chapleau, L., & Pozzo-Miller. (2008). DENDRITIC SPINE PATHOLOGIES IN HIPPOCAMPAL PYRAMIDAL NEURONS FROM RETT SYNDROME BRAIN AND AFTER EXPRESSION OF RETT-ASSOCIATED MECP2 MUTATIONS. *Neurobiology Disease*, 23(1), 1-

7.

- Chuang, J.-Z., Yeh, T.-Y., Bollati, F., Conde, C., Canavosio, F., Caceres, A., & Sung, C. (2013). The Dynein Light Chain Tctex-1 Has a Dynein-Independent Role in Actin Remodeling during Neurite Outgrowth. *Developmental Cell*, *9*(1), 1-21.
- 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), 121-127.
- Cocker, P. J., Rotge, J. Y., Daniel, M. L., Belin-Rauscent, A., & Belin, D. (2019). Impaired decision making following escalation of cocaine self-administration predicts vulnerability to relapse in rats. *Addiction Biology*, *25*(3), 1-9.
- Coleman, S. K., Cai, C., Mottershead, D. G., Haapalahti, J. P., & Keinänen, K. (2003). Surface expression of GluR-D AMPA receptor is dependent on an interaction between its C-terminal domain and a 4.1 Protein. *Journal of Neuroscience*, *23*(3), 798-806.
- 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.
- Conway, K. P., Swendsen, J. D., Rounsaville, B. J., & Merikangas, K. R. (2002). Personality, drug of choice, and comorbid psychopathology among substance abusers. *Drug and Alcohol Dependence*, *65*(3), 225-234.
- Cornish, J. L., Duffy, P., & Kalivas, P. W. (1999). A role for nucleus accumbens glutamate transmission in the relapse to cocaine-seeking behavior. *Neuroscience*, *93*(4), 1359-1367.
- Cornish, J. L., & Kalivas, P. W. (2000). Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *20*(15), 1-5.
- Covington, H. E., Lobo, M. K., Maze, I., Vialou, V., Hyman, J. M., Zaman, S., LaPlant, Q., Mouzon, E., Ghose, S., Tamminga, C. A., Neve, R. L., Deisseroth, K., & Nestler, E. J. (2010). Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, *30*(48), 16082-16090.
- Covington, H. E., & Miczek, K. A. (2001). Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine: Effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration «binges». *Psychopharmacology*, *158*(4), 388-398.
- Covington, H. E., & Miczek, K. A. (2005). Intense cocaine self-administration after episodic social defeat stress, but not after aggressive behavior: Dissociation from corticosterone activation. *Psychopharmacology*, *183*(3), 331-340.
- Cunninghamb, C. L., & Noble, D. (1992). Methamphetamine-induced Conditioned Place Preference or Aversion Depending on Dose and Presence of Drug. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *28*(3), 431-433.
- Davis, W. M., & Smith, S. G. (1976). Role of conditioned reinforcers in the initiation, maintenance and extinction of drug-seeking behavior. *The Pavlovian journal of biological science : official journal of the Pavlovian*, *11*(4), 222-236.
- Deminière, J. M., Piazza, P. V., Guegan, G., Abrous, N., Maccari, S., Moal, M. Le, & Simon, H. (1992).

- Increased locomotor response to novelty and propensity to intravenous amphetamine self-administration in adult offspring of stressed mothers. *Brain Research*, 586(1), 135-139.
- Depoy, L. M., McClung, C. A., & Logan, R. W. (2017). Neural mechanisms of circadian regulation of natural and drug reward. *Neural Plasticity*, 2017(5720842).
- Di Chiara, G. (1998). A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *Journal of Psychopharmacology*, 12(1), 54-67.
- Di Chiara, G. (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: Differential role in behavior and addiction. *Behavioural Brain Research*, 137(1-2), 75-114.
- 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(3), 341-360.
- Di Ciano, P., & Everitt, B. J. (2004). Conditioned reinforcing properties of stimuli paired with self-administered cocaine, heroin or sucrose: Implications for the persistence of addictive behaviour. *Neuropharmacology*, 47(SUPPL. 1), 202-213.
- Díaz-Otañez, C. S., Capriles, N. D. R., & Cancela, L. M. (1997). D1 and D2 dopamine and opiate receptors are involved in the restraint stress-induced sensitization to the psychostimulant effects of amphetamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58(1), 9-14.
- Dietz, D. M., Sun, H., Lobo, M. K., Cahill, M. E., Chadwick, B., Gao, V., Koo, J. W., Mazei-robison, M. S., Dias, C., Maze, I., Dietz, K. C., Scobie, K. N., Ferguson, D., Ohnishi, Y., Hodes, G. E., Zheng, Y., Neve, R. L., & Klaus, M. (2012). Essential Role for Rac1 in Cocaine-Induced Structural Plasticity of Nucleus Accumbens Neurons. *Nature Neuroscience*, 15(6), 891-896.
- Ding, Z. B., Wu, P., Luo, Y. X., Shi, H. S., Shen, H. W., Wang, S. J., & Lu, L. (2013). Region-specific role of Rac in nucleus accumbens core and basolateral amygdala in consolidation and reconsolidation of cocaine-associated cue memory in rats. *Psychopharmacology*, 228(3), 427-437.
- Dobi, A., Seabold, G. K., Christensen, C. H., Bock, R., & Alvarez, V. A. (2011). Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal. *Journal of Neuroscience*, 31(5), 1895-1904.
- Dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., & Tsubakihara, M. (2003). Actin Binding Proteins : Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiological Reviews*, 83, 433-473.
- Dube, S. R., Felitti, V. J., Dong, M., Chapman, D. P., Giles, W. H., & Anda, R. F. (2003). Childhood abuse, neglect, and household dysfunction and the risk of illicit drug use: The adverse childhood experiences study. *Pediatrics*, 111(3), 564-572.
- Ducret, E., Puaud, M., Lacoste, J., Belin-Rauscent, A., Fouyssac, M., Dugast, E., Murray, J. E., Everitt, B. J., Houeto, J. L., & Belin, D. (2016). N-acetylcysteine Facilitates Self-Imposed Abstinence After Escalation of Cocaine Intake. *Biological Psychiatry*, 80(3), 226-234.
- Dumitriu, D., Hao, J., Hara, Y., Kaufmann, J., Janssen, W. G. M., Lou, W., Rapp, P. R., & Morrison, J. H. (2010). Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *Journal of Neuroscience*, 30(22), 7507-7515.
- Dumitriu, D., Laplant, Q., Grossman, Y. S., Dias, C., Janssen, W. G., Russo, S. J., Morrison, J. H., & Nestler, E. J. (2012). Subregional, dendritic compartment, and spine subtype specificity in cocaine



- regulation of dendritic spines in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 32(20), 6957-6966.
- Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M., & Gill, G. N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biology*, 1(5), 253-259.
- Ehlers, M. D. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron*, 28(2), 511-525.
- 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. *European Journal of Neuroscience*, 36(8), 3103-3117.
- Fallon, J. H., Riley, J. N., & Moore, R. Y. (1978). Substantia nigra dopamine neurons: separate populations project to neostriatum and allocortex. *Neuroscience Letters*, 7(2-3), 157-162.
- Famous, K. R., Kumaresan, V., Sadri-Vakili, G., Schmidt, H. D., Mierke, D. F., Cha, J. H. J., & Pierce, R. C. (2008). Phosphorylation-dependent trafficking of GluR2-containing AMPA receptors in the nucleus accumbens plays a critical role in the reinstatement of cocaine seeking. *Journal of Neuroscience*, 28(43), 11061-11070.
- Fan, C., Zhu, X., Song, Q., Wang, P., Liu, Z., & Yu, S. Y. (2018). MiR-134 modulates chronic stress-induced structural plasticity and depression-like behaviors via downregulation of Limk1/cofilin signaling in rats. *Neuropharmacology*, 131, 364-376.
- Fedulov, V., Rex, C. S., Simmons, D. A., Palmer, L., Gall, C. M., & Lynch, G. (2007). Evidence that long-term potentiation occurs within individual hippocampal synapses during learning. *Journal of Neuroscience*, 27(30), 8031-8039.
- Ferrario, C. R., Li, X., Wang, X., Reimers, J. M., Uejima, J. L., & Wolf, M. E. (2010). The role of glutamate receptor redistribution in locomotor sensitization to cocaine. *Neuropsychopharmacology*, 35(3), 818-833.
- Ferrario, C. R., & Robinson, T. E. (2007). Amphetamine pretreatment accelerates the subsequent escalation of cocaine self-administration behavior. *European Neuropsychopharmacology*, 17(5), 352-357.
- Fifková, E., & Anderson, C. L. (1981). Stimulation-induced changes in dimensions of stalks of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Experimental Neurology*, 74(2), 621-627.
- Floresco, S. B. (2015). The nucleus accumbens: An interface between cognition, emotion, and action. *Annual Review of Psychology*, 66, 25-32.
- Folkman, S. (2013). Stress: Appraisal and Coping. En M. D. Gellman & J. R. Turner (Eds.), *Encyclopedia of Behavioral Medicine* (pp. 1913-1915). Springer New York.
- Fothergill, K. E., & Ensminger, M. E. (2006). Childhood and adolescent antecedents of drug and alcohol problems: A longitudinal study. *Drug and Alcohol Dependence*, 82(1), 61-76.
- Fox, M. E., Chandra, R., Menken, M. S., Larkin, E. J., Nam, H., Engeln, M., Francis, T. C., & Lobo, M. K. (2018). Dendritic remodeling of D1 neurons by RhoA/Rho-kinase mediates depression-like behavior. *Molecular Psychiatry*, 25(5), 1022-1034.
- 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. *Scientific Reports*, 10(1), 1-7.
- Francis, T. C., Chandra, R., Friend, D. M., Finkel, E., Dayrit, G., Brooks, J. M., Iñiguez, S. D., Donnell, P.

- O., & Kravitz, A. (2015). Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes Mediate Depression-Related Outcomes to Social Defeat Stress. *Biological Psychiatry*, *77*(3), 212-222.
- Francis, T. C., & Lobo, M. K. (2017). Emerging Role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes in Depression. *Biological Psychiatry*, *81*(8), 645-653.
- Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K., & Inokuchi, K. (2003). Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*, *38*(3), 447-460.
- Gaiardi, M., Bartoletti, M., Bacchi, A., Gubellini, C., Costa, M., & Babbini, M. (1991). Role of repeated exposure to morphine in determining its affective properties: place and taste conditioning studies in rats. *Psychopharmacology*, *103*(2), 183-186.
- Ganeshina, O., Berry, R. W., Petralia, R. S., Nicholson, D. A., & Geinisman, Y. (2004). Differences in the Expression of AMPA and NMDA Receptors between Axospinous Perforated and Nonperforated Synapses Are Related to the Configuration and Size of Postsynaptic Densities. *Journal of Comparative Neurology*, *468*(1), 86-95.
- Gao, T. T., Wang, Y., Liu, L., Wang, J. L., Wang, Y. J., Guan, W., Chen, T. T., Zhao, J., & Jiang, B. (2020). LIMK1/2 in the mPFC plays a role in chronic stress-induced depressive-like effects in mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *23*(12), 821-836.
- Garcia-Keller, C., Kupchik, Y. M., Gipson, C. D., Brown, R. M., 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. *Molecular Psychiatry*, *21*(8), 1063-1069.
- Garcia-Keller, C., Martinez, S., Esparza, A., Bollati, F., Kalivas, P., & Cancela, L. (2013). Cross-Sensitization Between Cocaine and Acute Restraint Stress is Associated with Sensitized Dopamine but not Glutamate Release in the Nucleus Accumbens. *European Journal of Neuroscience*, *37*(6), 982-995.
- Garcia-Keller, C., Neuhofer, D., Bobadilla, A. C., Spencer, S., Chioma, V. C., Monforton, C., & Kalivas, P. W. (2019). Extracellular Matrix Signaling Through  $\beta 3$  Integrin Mediates Cocaine Cue-Induced Transient Synaptic Plasticity and Relapse. *Biological Psychiatry*, *86*(5), 377-387.
- Garcia-Keller, C., Scofield, M. D., Neuhofer, D., Varanasi, S., Reeves, M. T., Anderson, E., Richie, C. T., Mejias-Aponte, C., Pickel, J., Hope, B. T., K. Harvey, B., Cowan, C. W., & Kalivas, P. W. (2020). Relapse-associated Transient Synaptic Potentiation Requires Integrin-mediated Activation of Focal Adhesion Kinase and Cofilin in D1-expressing Neurons. *Journal of Neuroscience*, July.
- Garcia-Keller, C., Smiley, C., Monforton, C., Melton, S., Kalivas, P. W., & Gass, J. (2019). N-Acetylcysteine treatment during acute stress prevents stress-induced augmentation of addictive drug use and relapse. *Addiction Biology*, *25*(5), 1-12.
- Garcia Rojo, G., Fresno, C., Vilches, N., Díaz-Véliz, G., Mora, S., Aguayo, F., Pacheco, A., Parra-Fiedler, N., Parra, C., Rojas, P. S., Tejos, M., Aliaga, E., & Fiedler, J. L. (2017). The ROCK inhibitor Fasudil prevents chronic restraint stress-induced depressive-like behaviors and dendritic spine loss in rat hippocampus. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 1-38.
- Gawin, F. H. (1980). Cocaine Addiction: Psychology and Neurophysiology. *Science*, *251*(11).

- Gelernter, J., & Kranzler, H. R. (2009). Genetics of alcohol dependence. *Human Genetics*, 126(1), 91-99.
- Gilad, G. M., Gilad, V. H., Wyatt, R. J., & Tizabi, Y. (1990). Region-selective stress-induced increase of glutamate uptake and release in rat forebrain. *Brain Research*, 525, 335-338.
- Gipson, C. D., Kupchik, Y. M., Shen, H., Reissner, K. J., Thomas, C. A., & Kalivas, P. W. (2013). Relapse induced by cues predicting cocaine depends on rapid, transient synaptic potentiation. *Neuron*, 77(5), 867-872.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 9124-9129.
- Goeders, N. E., & Guerin, G. F. (1994). Non-contingent electric footshock facilitates the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology*, 114(1), 63-70.
- Golden, S. A. and, & Russo, S. J. (2012). Mechanisms of Psychostimulant-Induced Structural Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(10).
- Golden, S. A., Christoffel, D. J., Heshmati, M., Hodes, G. E., Magida, J., Davis, K., Cahill, M. E., Dias, C., Ribeiro, E., Ables, J. L., Kennedy, P. J., Robison, A. J., Gonzalez-Maeso, J., Neve, R. L., Turecki, G., Ghose, S., Tamminga, C. A., & Russo, S. J. (2013). Epigenetic regulation of RAC1 induces synaptic remodeling in stress disorders and depression. *Nature Medicine*, 19(3), 337-344.
- Goodson, M., Rust, M. B., Witke, W., Bannerman, D., Mott, R., Ponting, C. P., & Flint, J. (2012). Cofilin-1: A Modulator of Anxiety in Mice. *PLoS Genetics*, 8(10).
- Görlich, A., Wolf, M., Zimmermann, A. M., Gurniak, C. B., Al Banchaabouchi, M., Sassoè-Pognetto, M., Witke, W., Friauf, E., & Rust, M. B. (2011). N-cofilin can compensate for the loss of ADF in excitatory synapses. *PLoS ONE*, 6(10).
- Govek, E. E., Newey, S. E., Akerman, C. J., Cross, J. R., Der Veken, L. Van, & Van Aelst, L. (2004). The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nature Neuroscience*, 7(4), 364-372.
- Grant, B. F., Stinson, F. S., Dawson, D. A., Chou, S. P., Dufour, M. C., Compton, W., Pickering, R. P., & Kaplan, K. (2004). Prevalence and Co-occurrence of Substance Use Disorders and Independent Mood and Anxiety Disorders. *Archives of General Psychiatry*, 61(8), 807.
- Groc, L., & Choquet, D. (2006). AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: Multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 423-438.
- Groenewegen, H. J., Wright, C. I., Beijer, A. V. J., & Voorn, P. (1999). Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, 49-63.
- Gu, J., Lee, C. W., Fan, Y., Komlos, D., Tang, X., Sun, C., Kuain Yu, Hartzell, H. C., Chen, G., Bamburg, J. R., & Zheng, J. Q. (2010). ADF/Cofilin-Mediated Actin Dynamics Regulate AMPA Receptor Trafficking during Synaptic Plasticity. *Nat Neurosci*, 13(10), 1280-1215.
- Hadaway, P. F., Alexander, B. K., Coombs, R. B., & Beyerstein, B. (1979). The effect of housing and gender on preference for morphine-sucrose solutions in rats. *Psychopharmacology*, 66(1), 87-91.
- Hahn, B., Zacharko, R. M., & Anisman, H. (1986). Alterations of amphetamine elicited perseveration and locomotor excitation following acute and repeated stressor application. *Pharmacology, Biochemistry*

- and Behavior*, 25(1), 29-33.
- Haney, M., Maccari, S., Le Moal, M., Simon, H., & Vincenzo Piazza, P. (1995). Social stress increases the acquisition of cocaine self-administration in male and female rats. *Brain Research*, 698(1-2), 46-52.
- Hao, Y., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2010). Behavioral and functional evidence of metabotropic glutamate receptor 2/3 and metabotropic glutamate receptor 5 dysregulation in cocaine-escalated rats: Factor in the transition to dependence. *Biological Psychiatry*, 68(3), 240-248.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience*, 5(5), 405-414.
- Harris, K. M. (1994). DENDRITIC SPINES: CELLULAR SPECIALIZATIONS IMPARTING BOTH STABILITY AND FLEXIBILITY TO SYNAPTIC FUNCTION. *Annual review of Neuroscience*, 17(3), 41-71.
- Harris, K. M., Jensen, F. E., & Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: Implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 12(8).
- Harrison, P. A., Fulkerson, J. A., & Beebe, T. J. (1997). Multiple substance use among adolescent physical and sexual abuse victims. *Child Abuse and Neglect*, 21(6), 529-539.
- Heasman, S. J., & Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: New insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(9), 690-701.
- Heimer, L., Zahm, 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(1), 89-125.
- Hering, H., & Sheng, M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(12), 151-162.
- Herman, J. P., Stinus, L., & Le Moal, M. (1984). Repeated stress increases locomotor response to amphetamine. *Psychopharmacology*, 84(3), 431-435.
- Hild, G., Kalmár, L., Kardos, R., Nyitrai, M., & Bugyi, B. (2014). The other side of the coin: Functional and structural versatility of ADF/cofilins. *European Journal of Cell Biology*, 93(5-6), 238-251.
- Hill, C. S., Wynne, J., & Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, 81(7), 1159-1170.
- Hofer, S. B., Mrsic-Flogel, T. D., Bonhoeffer, T., & Hübener, M. (2009). Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature*, 457(7227), 313-317.
- Holtmaat, A. J. G. D., Trachtenberg, J. T., Wilbrecht, L., Shepherd, G. M., Zhang, X., Knott, G. W., & Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, 45(2), 279-291.
- Holtmaat, A., & Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(9), 647-658.
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2008). The Subspine Organization of Actin Fibers Regulates the Structure and Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron*, 57(5), 719-729.
- Hooks, M. S., Jones, G. H., Juncos, J. L., Neill, D. B., & Justice, J. B. (1994). Individual differences in

- schedule-induced and conditioned behaviors. *Behavioural Brain Research*, 60(2), 199-209.
- Hopf, F. W., & Lesscher, H. M. B. (2014). Rodent models for compulsive alcohol intake. *Alcohol*, 48(3), 253-264.
- Horger, B. A., Shelton, K., & Schenk, S. (1990). Preexposure sensitizes rats to the rewarding effects of cocaine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 37(4), 707-711.
- Hotsenpiller, G., Giorgetti, M., & Wolf, M. E. (2001). Alterations in behaviour and glutamate transmission following presentation of stimuli previously associated with cocaine exposure. *European Journal of Neuroscience*, 14(11), 1843-1855.
- Hotulainen, P., Llano, O., Smirnov, S., Tanhuanpää, K., Faix, J., Rivera, C., & Lappalainen, P. (2009). Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during Dendritic spine morphogenesis. *Journal of Cell Biology*, 185(2), 323-339.
- Hu, X. T., & White, F. J. (1996). Glutamate receptor regulation of rat nucleus accumbens neurons in vivo. *Synapse*, 23(3), 208-218.
- Hyman, S. E., & Malenka, R. C. (2001). ADDICTION AND THE BRAIN: THE NEUROBIOLOGY OF COMPULSION AND ITS PERSISTENCE. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10), 695-703.
- Irie, F., & Yamaguchi, Y. (2002). EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nature Neuroscience*, 5(11), 1117-1118.
- Ito, R., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2004). Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nature Neuroscience*, 7(4), 389-397.
- Jacobsen, L. K., Southwick, S. M., & Kosten, T. R. (2003). Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: A review of the literature. *Dual Diagnosis*, 111-123.
- Jedema, H. P., & Moghaddam, B. (1994). Glutamatergic Control of Dopamine Release During Stress in the Rat Prefrontal Cortex. *Journal of Neurochemistry*, 63(2), 8-785.
- Jiang, L., Mao, R., Zhou, Q., Yang, Y., Cao, J., Ding, Y., Yang, Y., Zhang, X., Li, L., & Xu, L. (2016). Inhibition of Rac1 Activity in the Hippocampus Impairs the Forgetting of Contextual Fear Memory. *Molecular Neurobiology*, 53(2), 1247-1253.
- Johanson, C. E., & Fischman, M. W. (1989). The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacological Reviews*, 41(1), 3-52.
- 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. *Neuroscience Letters*, 14(2-3), 207-212.
- Kalivas, P. W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(8), 561-572.
- Kalivas, P. W., & Duffy, P. (1989). Similar effects of daily cocaine and stress on mesocorticolimbic dopamine neurotransmission in the rat. *Biological Psychiatry*, 25(7), 913-928.
- Kalivas, P. W., & Duffy, P. (1990). Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Synapse*, 5(1), 48-58.
- Kalivas, P. W., & O'Brien, C. (2008). Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 166-180.
- Kalivas, P. W., & Stewart, J. (1991). Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Research Reviews*, 16, 223-244.

- Kalivas, P. W., & Volkow, N. D. (2005). The neural basis of addiction: A pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*, *162*(8), 1403-1413.
- Kandel, D. B., Johnson, J. G., Bird, H. R., Canino, G., Goodman, S. H., Lahey, B. B., Regier, D. A., & Schwab-Stone, M. (1997). Psychiatric disorders associated with substance use among children and adolescents: Findings from the methods for the epidemiology of child and adolescent mental disorders (MECA) study. *Journal of Abnormal Child Psychology*, *25*(2), 121-132.
- Kapitein, L. C., Schlager, M. A., Kuijpers, M., Wulf, P. S., van Spronsen, M., MacKintosh, F. C., & Hoogenraad, C. C. (2010). Mixed Microtubules Steer Dynein-Driven Cargo Transport into Dendrites. *Current Biology*, *20*(4), 290-299.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*, *26*(7), 360-368.
- Katz, J. L. (1990). Models of relative reinforcing efficacy of drugs and their predictive utility. En *Behavioural Pharmacology* (Vol. 1, Número 4, pp. 283-301).
- Kauer, J. A. (2004). Learning mechanisms in addiction: Synaptic plasticity in the ventral tegmental area as a result of exposure to drugs of abuse. *Annual Review of Physiology*, *66*, 447-475.
- Kauer, J. A., & Malenka, R. C. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(11), 844-858.
- Keck, T., Mrsic-Flogel, T. D., Vaz Afonso, M., Eysel, U. T., Bonhoeffer, T., & Hübener, M. (2008). Massive restructuring of neuronal circuits during functional reorganization of adult visual cortex. *Nature Neuroscience*, *11*(10), 1162-1167.
- Kelley, A. (1999). Functional Specificity of Ventral Striatal Compartments in Appetitive Behaviors. *ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, *29*(6), 877-890.
- Kelz, M. B., Chen, J., Carlezon, W. A., Whisler, K., Gilden, L., Beckmann, A. M., Steffen, C., Zhang, Y. J., Marotti, L., Self, D. W., Tkatch, T., Baranauskas, G., Surmeler, D. J., Neve, R. L., Duman, R. S., Picciotto, M. R., & Nestler, E. J. (1999). Expression of the transcription factor  $\Delta$ FosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature*, *401*(6750), 272-276.
- Kennedy, M. J., & Ehlers, M. D. (2006). Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, *29*, 325-362.
- Kessels, H. W., & Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron*, *61*(3), 340-350.
- Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., & Walters, E. E. (2005). Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of. *Archives of General Psychiatry (JAMA Psychiatry)*, *62*(June), 593-602.
- Khibnik, L. A., Beaumont, M., Doyle, M., Heshmati, M., Slesinger, P. A., Nestler, E. J., & Russo, S. J. (2016). Stress and Cocaine Trigger Divergent and Cell Type-Specific Regulation of Synaptic Transmission at Single Spines in Nucleus Accumbens. *Biological Psychiatry*, *79*(11), 898-905.
- 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. *Biological Psychiatry*, *69*(11), 1026-1034.
- Kim, Y., Teylan, M. A., Baron, M., Sands, A., Nairn, A. C., & Greengard, P. (2009). Methylphenidate-induced dendritic spine formation and  $\Delta$ FosB expression in nucleus accumbens. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2915-2920.
- Kiraly, D. D., Ma, X.-M., Christopher M. Mazzone, X. X., Mains, R. E., & Eipper, B. A. (2010). Behavioral and morphological responses to cocaine require Kalirin7. *Biol Psychiatry*, 68(1), 249-255.
- Klawonn, A. M., & Malenka, R. C. (2018). Nucleus accumbens modulation in reward and aversion. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 83, 119-129.
- Knackstedt, L. A., & Kalivas, P. W. (2007). Extended access to cocaine self-administration enhances drug-primed reinstatement but not behavioral sensitization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(3), 1103-1109.
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2001). Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24(2), 97-129.
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2005). Plasticity of reward neurocircuitry and the «dark side» of drug addiction. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1442-1444.
- Kosten, T. R., Rounsaville, B. J., & Kleber, H. D. (1986). A 2.5-Year Follow-up of Depression, Life Crises, and Treatment Effects on Abstinence Among Opioid Addicts. *Archives of General Psychiatry*, 43(8), 733-738.
- Kourrich, S., Rothwell, P. E., Klug, J. R., & Thomas, M. J. (2007). Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 27(30), 7921-7928.
- Koya, E., Golden, S. A., Harvey, B. K., Guez-Barber, D. H., Berkow, A., Simmons, D. E., Bossert, J. M., Nair, S. G., Uejima, J. L., Marin, M. T., Mitchell, T. B., Farquhar, D., Ghosh, S. C., Mattson, B. J., & Hope, B. T. (2009). Targeted disruption of cocaine-activated nucleus accumbens neurons prevents context-specific sensitization. *Nature Neuroscience*, 12(8), 1069-1073.
- Kozma, R., Sarner, S., Ahmed, S., & Lim, L. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), 1201-1211.
- Krishnan, V., Han, M. H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., LaPlant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D. C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T. A., Neve, R. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A. J., Self, D. W., ... Nestler, E. J. (2007). Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell*, 131(2), 391-404.
- Kruijssen, D. L. H., & Wierenga, C. J. (2019). Single Synapse LTP: A Matter of Context? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(11), 496.
- Kruyer, A., Ball, L. E., Townsend, D. M., Kalivas, P. W., & Uys, D. (2019). Post-translational S-glutathionylation of cofilin increases actin cycling during cocaine seeking. *Plos One*, 14(9), 1-15.
- Kruzich, P. J., & Xi, J. (2006). Different patterns of pharmacological reinstatement of cocaine-seeking behavior between Fischer 344 and Lewis rats. *Psychopharmacology*, 187(1), 22-29.
- Lai, K. O., & Ip, N. Y. (2013). Structural plasticity of dendritic spines: The underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2257-2263.
- Lammel, S., Kook Lim, B., & Malenka, R. C. (2014). Reward and aversion in a heterogeneous midbrain

- dopamine system. *Neuropharmacology*, 76(1).
- Lammel, S., Roeper, J., & Malenka, R. C. (2011). Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron*, 23(1), 1-7.
- Laplant, Q., Vialou, V., Covington, H. E., Dumitriu, D., Feng, J., Warren, B. L., Maze, I., Dietz, D. M., Watts, E. L., Iñiguez, S. D., Koo, J. W., Mouzon, E., Renthal, W., Hollis, F., Wang, H., Noonan, M. A., Ren, Y., Eisch, A. J., Bolaños, C. A., ... Nestler, E. J. (2010). Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, 13(9), 1137-1143.
- Lau, C. G., & Zukin, R. S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 413-426.
- Le Moal, M., & Simon, H. (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: Functional and regulatory roles. En *Physiological Reviews* (Vol. 71, Número 1).
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3399-3404.
- Lett, B. T. (1989). Repeated exposures intensify rather than diminish the rewarding effects of amphetamine, morphine, and cocaine. *Psychopharmacology*, 98(3), 357-362.
- Leyton, M., Boileau, I., Benkelfat, C., Diksic, M., Baker, G., & Dagher, A. (2002). Amphetamine-Induced Increases in Extracellular Dopamine , Drug Wanting , and Novelty Seeking : A PET <sup>[11C]</sup> Raclopride Study in Healthy Men. *Neuropsychopharmacology*, 27(6), 1027-1035.
- Leyton, M., & Stewart, J. (1990). Preexposure to foot-shock sensitizes the locomotor response to subsequent systemic morphine and intra-nucleus accumbens amphetamine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 37(2), 303-310.
- Li, J., Zhang, L., Chen, Z., Xie, M., Huang, L., Xue, J., Liu, Y., Liu, N., Guo, F., Zheng, Y., Kong, J., Zhang, L., & Zhang, L. (2015). Cocaine activates Rac1 to control structural and behavioral plasticity in caudate putamen. *Neurobiology of Disease*, 75, 159-176.
- Li, Y., Acerbo, M. J., & Robinson, T. E. (2004). The induction of behavioural sensitization is associated with cocaine-induced structural plasticity in the core (but not shell) of the nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 20(6), 1647-1654.
- Li, Y., & Wolf, M. E. (1997). Ibotenic acid lesions of prefrontal cortex do not prevent expression of behavioral sensitization to amphetamine. *Behavioural Brain Research*, 84(1-2), 285-289.
- Linseman, D. A., & Loucks, F. A. (2008). Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death. *Frontiers in Bioscience*, 13(2), 657-676.
- Lisman, J. (2003). Long-term potentiation: Outstanding questions and attempted synthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1432), 829-842.
- Lobo, M. K., Covington III, H. E., Dipesh, C., Friedman, A. K., Sun, H., Damez-Werno, D., Dietz, D. M., Zaman, S., Koo, J. W., Kennedy, P. J., Mouzon, E., Mogri, M., Neve, R. L., Deisseroth, K., Han, M.-H., & Nestler, E. J. (2010). Cell Type-Specific Loss of BDNF Signaling Mimics Optogenetic Control of Cocaine Reward. *Science*, 330(10), 385-391.
- Lobo, M. K., & Nestler, E. J. (2011). The striatal balancing act in drug addiction: Distinct roles of direct



- and indirect pathway medium spiny neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5(7), 1-11.
- López, J. F., Akil, H., & Watson, S. J. (1999). Neural circuits mediating stress. *Biological Psychiatry*, 46(11), 1461-1471.
- 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. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(5), 457-491.
- Lu, Y., Sun, G., Yang, F., Guan, Z., Zhang, Z., Zhao, J., Liu, Y., Chua, L., & Pei, L. (2019). Baicalin regulates depression behavior in mice exposed to chronic mild stress via the Rac/ LIMK/cofilin pathway. *Biomed Pharmacother*, 116(209).
- Lua, B. L., & Low, B. C. (2005). Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control. *FEBS Letters*, 579(3), 577-585.
- Lucantonio, F., Kambhampati, S., Haney, R. Z., Atalayer, D., Rowland, N. E., Shaham, Y., & Schoenbaum, G. (2015). Effects of Prior Cocaine Versus Morphine or Heroin Self-Administration on Extinction Learning Driven by Overexpectation Versus Omission of Reward. *Biological Psychiatry*, 77(10), 912-920.
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*, 69(4), 650-663.
- MacAskill, A. F., Cassel, J. M., & Carter, A. G. (2014). Cocaine exposure reorganizes cell type- and input-specific connectivity in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, 17(9), 1198-1207.
- Maccari, S., Piazza, P. V., Deminière, J. M., Lemaire, V., Mormède, P., Simon, H., Angelucci, L., & Le Moal, M. (1991). Life events-induced decrease of corticosteroid type I receptors is associated with reduced corticosterone feedback and enhanced vulnerability to amphetamine self-administration. *Brain Research*, 547(1), 7-20.
- Maciver, S. K., Zot, H. G., & Pollard, T. D. (1991). Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Cell Biology*, 115(6), 1611-1620.
- MacLennan, A. J., & Maier, S. F. (1983). Coping and the stress-induced potentiation of stimulant stereotypy in the rat. *Science*, 219(4588), 1093-3.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., & Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, 285(5429), 895-898.
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1), 5-21.
- Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1999). Long-term potentiation - A decade of progress?. *Science*, 285(5435), 1870-1874.
- Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA RECEPTOR TRAFFICKING AND SYNAPTIC PLASTICITY. *Annual review of Neuroscience*, 25, 103-126.
- Mandt, B. H., Copenhagen, L. I., Zahniser, N. R., & Allen, R. M. (2015). Escalation of cocaine consumption in short and long access self-administration procedures. *Drug and Alcohol Dependence*, 149, 166-172.
- Mantsch, J. R., Yuferov, V., Mathieu-Kia, A. M., Ho, A., & Kreek, M. J. (2004). Effects of extended access to high versus low cocaine doses on self-administration, cocaine-induced reinstatement and brain

- mRNA levels in rats. *Psychopharmacology*, 175(1), 26-36.
- Marinelli, M., & Piazza, P. V. (2002). Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *European Journal of Neuroscience*, 16(3), 387-394.
- Markou, A., Weiss, F., Gold, L. H., Caine, S. B., Schulteis, G., & Koob, G. F. (1993). Animal models of drug craving. *Psychopharmacology*, 112(2-3), 163-182.
- Marks-Kaufman, R., & Lewis, M. J. (1984). Early housing experience modifies morphine self-administration and physical dependence in adult rats. *Addictive Behaviors*, 9(3), 235-243.
- Martin, S., Henley, J. M., Holman, D., Zhou, M., Wiegert, O., van Spronsena, M., Joëls, M., Hoogenraad, C. C., & Krugers, H. J. (2009). Corticosterone alters AMPAR mobility and facilitates bidirectional synaptic plasticity. *PLoS ONE*, 4(3), 1-8.
- Matsuo, N., Reijmers, L., & Mayford, M. (2008). Spine-Type-Specific Recruitment of Newly Synthesized AMPA Receptors with Learning. *Science*, 319(2), 1104-1107.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1086-1092.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429, 761-766.
- Matus, A. (2005). Growth of dendritic spines: a continuing story. *Current Opinion in Neurobiology*, 15, 67-72.
- McGee, A. W., & Brecht, D. S. (2003). Assembly and plasticity of the glutamatergic postsynaptic specialization. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(1), 111-118.
- McNair, K., Spike, R., Guilding, C., Prendergast, G. C., Stone, T. W., Cobb, S. R., & Morris, B. J. (2010). A role for RhoB in synaptic plasticity and the regulation of neuronal morphology. *Journal of Neuroscience*, 30(9), 3508-3517.
- Meaney, M. J., Brake, W., & Gratton, A. (2002). Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: A neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology*, 27(1-2), 127-138.
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., Lu, W. Y., MacDonald, J. F., Wang, J. Y., Falls, D. L., & Jia, Z. (2002). Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron*, 35(1), 121-133.
- 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 Structure and Function*, 213(1-2), 17-27.
- Michaelis, E. K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*, 54(4), 369-415.
- Miczek, K. A., & Mutschler, N. H. (1996). Activational effects of social stress on IV cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology*, 128(3), 256-264.
- Miczek, K. A., Yap, J. J., & Iii, H. E. C. (2008). Social stress, therapeutics and drug abuse: Preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacology*, 120(2), 102-128.
- Mizuno, K. (2013). Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and

- dephosphorylation. *Cellular Signalling*, 25(2), 457-469.
- Moal, M. Le, & Piazza, P. V. (1998). Individual differences in stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens are influenced by corticosterone. *European Journal of Neuroscience*, 10(8), 3903-3907.
- Mogenson, G. J., Ciriello, J., Garland, J., & Wu, M. (1987). Ventral pallidum projections to mediodorsal nucleus of the thalamus: an anatomical and electrophysiological investigation in the rat. *Brain Research*, 404(1-2), 221-230.
- Montagud-Romero, S., Blanco-Gandía, M. C., Reguilón, M. D., Ferrer-Pérez, C., Ballestín, R., Miñarro, J., & Rodríguez-Arias, M. (2018). Social defeat stress: Mechanisms underlying the increase in rewarding effects of drugs of abuse. *European Journal of Neuroscience*, 48(9), 2948-2970.
- Moon, I. S., Apperson, M. L., & Kennedy, M. B. (1994). The major tyrosine-phosphorylated protein in the postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9), 3954-3958.
- Morishita, W., Marie, H., & Malenka, R. C. (2005). Distinct triggering and expression mechanisms underlie LTD of AMPA and NMDA synaptic responses. *Nature Neuroscience*, 8(8), 1043-1050.
- Morrow, B. A., & Roth, R. H. (1996). Serotonergic Lesions Alter Cocaine-Induced Locomotor Behavior and Stress-Activation of the Mesocorticolimbic Dopamine System. *Stress*, 181(23), 174-181.
- Mullings, J. L., Hartley, D. J., & Marquart, J. W. (2004). Exploring the Relationship between Alcohol Use, Childhood Maltreatment, and Treatment Needs among Female Prisoners. *Substance Use and Misuse*, 39(2), 277-305.
- Nagy, V., Bozdagi, O., Matynia, A., Balcerzyk, M., Okulski, P., Dzwonek, J., Costa, R. M., Silva, A. J., Kaczmarek, L., & Huntley, G. W. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *Journal of Neuroscience*, 26(7), 1923-1934.
- Nakahata, Y., & Yasuda, R. (2018). Plasticity of Spine Structure : Local Signaling , Translation and Cytoskeletal Reorganization. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10(8), 1-13.
- Nakayama, A. Y., Harms, M. B., & Luo, L. (2000). Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, 20(14), 5329-5338.
- Nestler, E. J. (2001). MOLECULAR BASIS OF LONG-TERM PLASTICITY UNDERLYING ADDICTION. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(February), 119-128.
- Nestler, E. J., & Aghajanian, G. K. (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278(5335), 58-63.
- Nestler, E. J., Barrot, M., Dileone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., & Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of Depression Review. *Neuron*, 34, 13-25.
- Newcomb, M. D., & Bentler, P. M. (1988). Impact of Adolescent Drug Use and Social Support on Problems of Young Adults: A Longitudinal Study. *Journal of Abnormal Psychology*, 97(1), 64-75.
- Newey, S. E., Velamoor, V., Govek, E. E., & Van Aelst, L. (2005). Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *Journal of Neurobiology*, 64(1), 58-74.
- Newpher, T. M., & Ehlers, M. D. (2008). Glutamate Receptor Dynamics in Dendritic Microdomains. *Neuron*, 58(4), 472-497.

- Niciu, M. J., Kelmendi, B., & Sanacora, G. (2012). Overview of Glutamatergic Neurotransmission in the Nervous System. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 23(1), 1-7.
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology*, 64, 313-353.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., & Uemura, T. (2002). Control of actin reorganization by slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell*, 108(2), 233-246.
- Noguchi, J., Hayama, T., Watanabe, S., Ucar, H., Yagishita, S., Takahashi, N., & Kasai, H. (2016). State-dependent diffusion of actin-depolymerizing factor/cofilin underlies the enlargement and shrinkage of dendritic spines. *Scientific Reports*, 6(9), 1-9.
- Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2005). Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron*, 46(4), 609-622.
- Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G. C. R., Kitamura, K., Kano, M., Matsuzaki, M., & Kasai, H. (2011). In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *Journal of Physiology*, 589(10), 2447-2457.
- O'Brien, C. P., Ehrman, R. H., & Terns, J. N. (1986). Classical conditioning in human opioid dependence. *In Behavioral Analysis of Drug Dependence, S.R. Golderberg and I.P. Stolerman, eds. (London: Academic Press)*, 329.
- O'Doherty, F. (1991). Is drug use a response to stress?. *Drug and Alcohol Dependence*, 29(1), 97-106.
- Olson, M. F., Ashworth, A., & Hall, A. (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, 269(5228), 1270-1272.
- Osler, M., Nybo Andersen, A. M., Laursen, B., & Lawlor, D. A. (2007). Cognitive function in childhood and early adulthood and injuries later in life: The Metropolit 1953 male birth cohort. *International Journal of Epidemiology*, 36(1), 212-219.
- Quimette, P. C., Brown, P. J., & Najavits, L. M. (1998). Course and treatment of patients with both substance use and posttraumatic stress disorders. *Addictive Behaviors*, 23(6), 785-795.
- Quimette, P., Coolhart, D., Schum, J., Wade, M., & Brown, P. J. (2007). Precipitants of first substance use in recently abstinent substance use disorder patients with PTSD. *Addiction Biology*, 32, 1719-1727.
- 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. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 46(6), 233-965.
- Palmer, C. L., Cotton, L., & Henley, J. M. (2005). The molecular pharmacology and cell biology of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 253-277.
- Pan, H., Menacherry, S., & Justice, J. B. (1991). Differences in the Pharmacokinetics of Cocaine in Naive and Cocaine-Experienced Rats. *Journal of Neurochemistry*, 56, 1299-1306.

- Pascoli, V., Terrier, J., Espallergues, J., Valjent, E., O'connor, E. C., & Lüscher, C. (2014). Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature*, *509*(7501), 459-464.
- Paterson, N. E., & Markou, A. (2003). Increased motivation for self-administered cocaine after escalated cocaine intake. *NeuroReport*, *14*(17), 45-51.
- Paulson, P. E., Camp, D. M., & Robinson, T. E. (1991). Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology*, *103*(4), 480-492.
- Paxinos G & Watson C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. En D. 2007. Edn., 6th San Academic Press (Ed.), *6th Edn*.
- Pennartz, C. M. A., Boeijinga, P. H., & Lopes da Silva, F. H. (1990). Locally evoked potentials in slices of the rat nucleus accumbens: NMDA and non-NMDA receptor mediated components and modulation by GABA. *Brain Research*, *529*(1-2), 30-41.
- Pennartz, C. M. A., Groenewegen, H. J., Lopes, F. H., & Silva, D. A. (1994). THE NUCLEUS ACCUMBENS AS A COMPLEX OF FUNCTION ALL Y DISTINCT NEURONAL ENSEMBLES : AN INTEGRATI ON OF BEHAVIOURAL, ELECTROPHYSIOLOGICAL AND ANATOMICAL DATA. *Progress in Neurobiology*, *42*, 761-719.
- Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J.-E., & Woolfrey, K. M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, *14*(3), 285-293.
- Penzes, P., Johnson, R. C., Sattler, R., Zhang, X., Huganir, R. L., Kambampati, V., Mains, R. E., & Eipper, B. A. (2001). The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron*, *29*(1), 229-242.
- Penzes, P., & Rafalovich, I. (2012). Regulation of the actin cytoskeleton in dendritic spines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *970*, 81-95.
- Pertz, O. (2010). Spatio-temporal Rho GTPase signaling - Where are we now?. *Journal of Cell Science*, *123*(11), 1841-1850.
- Peters, A., & Kaiserman-Abramof, I. R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy*, *127*(4), 321-355.
- Piazza, P. V., Deminière, J.-M., Le Moal, M., & Hervé, S. (1989). Factors That Predict Individual Vulnerability to Amphetamine Self-Administration. *Science*, *30*(3), 6917.
- 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 Research*, *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. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *36*, 359-378.
- Piazza, P. V., & Moal, M. Le. (1998). The role of stress in drug self-administration. *Trends in Pharmacological Sciences*, *19*(2), 67-74.
- Piazza, P. V., Maccari, S., Deminiere, J. M., Le Moal, M., Mormede, P., & Simon, H. (1991). Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(6), 2088-2092.

- Pierce, C. R., 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. *The Journal of Neuroscience*, *16*(4), 1550-1560.
- Pierce, C. R., & Kalivas, P. W. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews*, *25*(2), 192-216.
- Pinheiro, J., Bates, D., Saikat, D., Sarkar, D., Siem, H., Bert Van, W., & R-core. (2020). *Package 'nlme'*. <https://svn.r-project.org/R-packages/trunk/nlme/>
- Pontrello, C. G., & Ethell, I. M. (2009). Accelerators, Brakes, and Gears of Actin Dynamics in Dendritic Spines. *The Open Neuroscience Journal*, *3*(2), 67-86.
- Pontrello, C. G., Sun, M. Y., Lin, A., Fiacco, T. A., DeFea, K. A., & Ethell, I. M. (2012). Cofilin under control of  $\beta$ -arrestin-2 in NMDA-dependent dendritic spine plasticity, long-term depression (LTD), and learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(7), 442-451.
- Post, R. M., Weiss, S. R. B., Fontana, D., & Pert, A. (1992). Conditioned Sensitization to the Psychomotor Stimulant Cocaine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *654*(1), 386-399.
- Pozzo-Miller, L. D., Inoue, T., & Murphy, D. D. (1999). Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca<sup>2+</sup> transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, *81*(3), 1404-1411.
- Purgianto, A., Scheyer, A. F., Loweth, J. A., Ford, K. A., Tseng, K. Y., & Wolf, M. E. (2013). Different adaptations in AMPA receptor transmission in the nucleus accumbens after short vs long access cocaine self-administration regimens. *Neuropsychopharmacology*, *38*(9), 1789-1797.
- Qiao, H., Li, M., Xu, C., Chen, H., An, S., & Ma, X. (2016). Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plasticity*, *2016*, 8056370.
- Racz, B., & Weinberg, R. J. (2006). Spatial organization of cofilin in dendritic spines. *Neuroscience*, *138*(2), 447-456.
- Ramsey, N. F., & Van Ree, J. M. (1993). Emotional but not physical stress enhances intravenous cocaine self-administration in drug-naive rats. *Brain Research*, *608*(2), 216-222.
- Rane, C. K., & Minden, A. (2014). P21 activated kinases: Structure, regulation, and functions. *Small GTPases*, *5*, e28003.
- Rao, A., & Craig, A. M. (2000). Signaling between the actin cytoskeleton and the postsynaptic density of dendritic spines. *Hippocampus*, *10*(5), 527-541.
- Reed, M. B., Wang, R., Shillington, A. M., Clapp, J. D., & Lange, J. E. (2007). The relationship between alcohol use and cigarette smoking in a sample of undergraduate college students. *Addictive Behaviors*, *32*(3), 449-464.
- Reid, M. S., & Berger, S. P. (1996). Evidence for sensitization of cocaine-induced nucleus accumbens glutamate release. *NeuroReport*, *7*, 1325-1329.
- Renner, M., Specht, C. G., & Triller, A. (2008). Molecular dynamics of postsynaptic receptors and scaffold proteins. *Current Opinion in Neurobiology*, *18*(5), 532-540.
- Roberts, D. C. S., Morgan, D., & Liu, Y. (2007). How to make a rat addicted to cocaine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *31*(8), 1614-1624.

- Robinson, T. E., Angus, A. L., & Becker, J. B. (1985). SENSITIZATION TO STRESS: THE ENDURING EFFECTS OF PRIOR STRESS ON AMPHETAMINE-INDUCED ROTATIONAL BEHAVIOR. *Life Sciences*, *37*, 1039-1042.
- Robinson, T. E., & Becker, J. B. (1986). Enduring Changes in Brain and Behavior Produced Psychosis by Chronic of Amphetamine Administration: A Review and Evaluation Animal Models of Amphetamine. *Brain Research Reviews*, *11*, 157-198.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, *8*, 247-291.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2001). Incentive-sensitization and addiction. *Addiction*, *96*(1), 103-114.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2008). The incentive sensitization theory of addiction: Some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *363*(1507), 3137-3146.
- Robinson, T. E., Gorny, G., Mitton, E., & Kolb, B. (2001). Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse*, *39*(3), 257-266.
- Robinson, T. E., Jurson, P. A., Bennett, J. A., & Bentgen, K. M. (1988). Persistent sensitization of dopamine neurotransmission in ventral striatum (nucleus accumbens) produced by prior experience with (+)-amphetamine: a microdialysis study in freely moving rats. *Brain Research*, *462*(2), 211-222.
- Robinson, T. E., & Kolb, B. (1997). Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *Journal of Neuroscience*, *17*(21), 8491-8497.
- Robinson, T. E., & Kolb, B. (1999a). Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *European Journal of Neuroscience*, *11*(5), 1598-1604.
- Robinson, T. E., & Kolb, B. (1999b). Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse*, *33*(2), 160-162.
- Robinson, T. E., & Kolb, B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology*, *47*, 33-46.
- Russo, S. J., Dietz, D. M., Dumitriu, D., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2010). The Addicted Synapse: Mechanisms of Synaptic and Structural Plasticity in Nucleus Accumbens. *Trends in neurosciences*, *33*(6), 267-276.
- Russo, S. J., Mazei-Robison, M. S., Ables, J. L., & Nestler, E. J. (2009). Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology*, *56*, 73-82.
- Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(9), 609-625.
- Rust, M. B. (2015). ADF/cofilin: a crucial regulator of synapse physiology and behavior. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(18), 9-3521.
- Rust, M. B., Gurniak, C. B., Renner, M., Vara, H., Morando, L., Görlich, A., Sassoè-Pognetto, M., Banchaabouchi, M. Al, Giustetto, M., Triller, A., Choquet, D., & Witke, W. (2010). Learning, AMPA

- receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO Journal*, 29(11), 1889-1902.
- 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(2), 577-582.
- Schenk, S., Gorman, K., & Amit, Z. (1990). Age-dependent effects of isolation housing on the self-administration of ethanol in laboratory rats. *Alcohol*, 7(4), 321-326.
- Schenk, S., Lacelle, G., Gorman, K., & Amit, Z. (1987). Cocaine self-administration in rats influenced by environmental conditions: implications for the etiology of drug abuse. *Neuroscience Letters*, 81(1-2), 227-231.
- Schlager, M. A., & Hoogenraad, C. C. (2009). Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Molecular Brain*, 2(25), 1-12.
- Schmidt, H., & Eilers, J. (2009). Spine neck geometry determines spino-dendritic cross-talk in the presence of mobile endogenous calcium binding proteins. *Journal of Computational Neuroscience*, 27(2), 229-243.
- Schuster, C. R., & Thompson, T. (1969). Self administration of and behavioral dependence on drugs. *Annual review of pharmacology*, 9(June), 483-502.
- Shaham, Y. (1993). Immobilization stress-induced oral opioid self-administration and withdrawal in rats: role of conditioning factors and the effect of stress on «relapse» to opioid drugs. *Psychopharmacology*, 111(4), 477-485.
- Shaham, Y., Alvares, K., Nespor, S. M., & Grunberg, N. E. (1992). Effect of stress on oral morphine and fentanyl self-administration in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 41(3), 615-619.
- Shaham, Y., & Stewart, J. (1994). Exposure to mild stress enhances the reinforcing efficacy of intravenous heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology*, 114(3), 523-527.
- Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., & Sabatini, B. L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- $\beta$  protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *Journal of Neuroscience*, 27(11), 2866-2875.
- Shen, H., Toda, S., Moussawi, K., Bouknight, A., Zahm, D. S., & Kalivas, P. W. (2009). Altered Dendritic Spine Plasticity in Cocaine-Withdrawn Rats. *The Journal of Neuroscience*, 29(9), 2876-2884.
- Shen, L., Liang, F., Walensky, L. D., & Huganir, R. L. (2000). Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4.1N-linked actin cytoskeletal association. *Journal of Neuroscience*, 20(21), 7932-7940.
- Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: A more quantitative view. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 823-847.
- Sheng, M., & Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a005678.
- Shi, S.-H., Hayashi, Y., Esteban, J. A., & Malinow, R. (2001). Subunit-Specific Rules Governing AMPA Receptor Trafficking to Synapses in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Cell*, 105(3), 331-343.
- Shi, Y., Pontrello, C. G., DeFea, K. A., Reichardt, L. F., & Ethell, I. M. (2009). Focal adhesion kinase acts downstream of EphB receptors to maintain mature dendritic spines by regulating cofilin activity.



- Journal of Neuroscience*, 29(25), 8129-8142.
- Sibley, D. R., Monsma, F. J. J., & Shen, Y. (1993). Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. *International Review of Neurobiology*, 35, 391-415.
- Sinha, R. (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse?. *Psychopharmacology*, 158(4), 343-359.
- Sinha, R. (2007). The role of stress in addiction relapse. *Current Psychiatry Reports*, 9(5), 388-395.
- Sinha, R. (2008). Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 23(1141), 105-130.
- Sinha, R. (2009). Stress and Addiction: A Dynamic Interplay of Genes, Environment, and Drug Intake. *Biological Psychiatry*, 66(2), 100-101.
- Sorg, B. A. (1992). Mesocorticolimbic Dopamine Systems: Cross-Sensitization between Stress and Cocaine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 654(1), 136-144.
- Sorg, B. A., & Kalivas, P. W. (1991). Effects of cocaine and footshock stress on extracellular dopamine levels in the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 53(3), 695-703.
- Sorra, K. E., & Harris, K. M. (2000). Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10(5), 501-511.
- Specker, S. M., Lac, S. T., & Carroll, M. E. (1994). Food deprivation history and cocaine self-administration: an animal model of binge eating. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 48(4), 1025-1029.
- Stankiewicz, T. R., & Linseman, D. A. (2014). Rho family GTPases : key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(10), 1-14.
- Star, E. N., Kwiatkowski, D. J., & Murthy, V. N. (2002). Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nature Neuroscience*, 5(3), 239-246.
- Stefen, H., Chaichim, C., Power, J., & Fath, T. (2016). Regulation of the Postsynaptic Compartment of Excitatory Synapses by the Actin Cytoskeleton in Health and Its Disruption in Disease. *Neural Plasticity*, 2016, 2371970.
- Suto, N., Tanabe, L. M., Austin, J. D., Creekmore, E., Pham, C. T., & Vezina, P. (2004). Previous Exposure to Psychostimulants Enhances the Reinstatement of Cocaine Seeking by Nucleus Accumbens AMPA. *Neuropsychopharmacology*, 29(12), 2149-2159.
- Swendsen, J., Conway, K. P., Degenhardt, L., Dierker, L., Glantz, M., Jin, R., Merikangas, K. R., Sampson, N., & Kessler, R. C. (2009). Socio-demographic risk factors for alcohol and drug dependence: The 10-year follow-up of the national comorbidity survey. *Addiction*, 104(8), 1346-1355.
- Takahashi, T., Svoboda, K., & Malinow, R. (2003). Experience Strengthening Transmission by Driving AMPA Receptors into Synapses. *Science*, 299(7), 1585-1589.
- Takahata, R., & Moghaddam, B. (1998). Glutamatergic Regulation of Basal and Stimulus-Activated Dopamine Release in the Prefrontal Cortex. *Journal of Neurochemistry*, 1(71), 1443-1449.
- Tashiro, A., Minden, A., & Yuste, R. (2000). Regulation of dendritic spine morphology by the Rho family of small GTPases: Antagonistic roles of Rac and Rho. *Cerebral Cortex*, 10(10), 927-938.
- Taylor, G. T., Weiss, J., & Rupich, R. (1987). Male rat behavior, endocrinology and reproductive physiology in a mixed-sex, socially stressful colony. *Physiology and Behavior*, 39(4), 429-433.

- Thomas, M. J., Beurrier, C., Bonci, A., & Malenka, R. C. (2001). Long-term depression in the nucleus accumbens: A neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nature Neuroscience*, 4(12), 1217-1223.
- Thomas, M. J., Kalivas, P. W., & Shaham, Y. (2008). Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *British Journal of Pharmacology*, 154(2), 327-342.
- Thomas, M. J., & Malenka, R. C. (2003). Synaptic plasticity in the mesolimbic dopamine system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1432), 815-819.
- Thomas, M. J., Malenka, R. C., & Bonci, A. (2000). Modulation of long-term depression by dopamine in the mesolimbic system. *Journal of Neuroscience*, 20(15), 5581-5586.
- Tidey, J. W., & Miczek, K. A. (1996). Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. *Brain Research*, 721(1-2), 140-149.
- Toda, S., Shen, H., & Kalivas, P. W. (2010). Inhibition of actin polymerization prevents cocaine-induced changes in spine morphology in the nucleus accumbens. *Neurotoxicity Research*, 18(3-4), 410-415.
- Toda, S., Shen, H., Peters, J., Cagle, S., & Kalivas, P. W. (2006). Cocaine Increases Actin Cycling: Effects in the Reinstatement Model of Drug Seeking. *The Journal of Neuroscience*, 26(5), 1579-1587.
- Tolias, K. F., Bikoff, J. B., Burette, A., Paradis, S., Harrar, D., Tavazoie, S., Weinberg, R. J., & Greenberg, M. E. (2005). The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron*, 45(4), 525-538.
- Tomie, A. (1996). Locating reward cue at response manipulandum (CAM) induces symptoms of drug abuse. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20(3), 505-535.
- Triffleman, E. ., Marmar, C. ., Delucchi, K. ., & Ronfeldt, H. (1995). Childhood trauma and posttraumatic Stress disorder in substance abuse inpatients. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 183(3), 172-176.
- Tu, G., Ying, L., Ye, L., Zhao, J., Liu, N., Li, J., Liu, Y., Zhu, M., Wu, Y., Xiao, B., Guo, H., Guo, F., Wang, H., Zhang, L., & Zhang, L. (2019). Dopamine D1 and D2 Receptors Differentially Regulate Rac1 and Cdc42 Signaling in the Nucleus Accumbens to Modulate Behavioral and Structural Plasticity After Repeated Methamphetamine Treatment. *Biological Psychiatry*, 86(11), 820-835.
- Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2004). HOMEOSTATIC PLASTICITY IN THE DEVELOPING NERVOUS SYSTEM. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(2), 97-107.
- Tyler, W. J., & Pozzo-Miller, L. (2003). Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *Journal of Physiology*, 553(2), 497-509.
- Ungless, M. A., Whistler, J. L., & Malenka, R. C. (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature*, 411(5), 583-587.
- Valadez, A., & Schenk, S. (1994). Persistence of the ability of amphetamine preexposure to facilitate acquisition of cocaine self-administration. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 47(1), 203-205.
- Van Troys, M., Huyck, L., Leyman, S., Dhaese, S., Vandekerkhove, J., & Ampe, C. (2008). Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *European Journal of Cell Biology*, 87(8-9), 649-667.
- Vanderschuren, L. J. M. ., & Pierce, C. R. (2010). Sensitization Processes in Drug Addiction. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 3(11), 179-175.

- Vanderschuren, L. J. M. J., Donné Schmidt, E., De Vries, T. J., Van Moorsel, C. A. P., Tilders, F. J. H., & Schoffelmeer, A. N. M. (1999). A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *Journal of Neuroscience*, *19*(21), 9579-9586.
- Vanderschuren, L. J. M. J., & Kalivas, P. W. (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychoneuroendocrinology*, *15*(1), 99-120.
- Vanderschuren, L. J. M. J., Tjon, G. H. K., Nestby, P., Mulder, A. H., Schoffelmeer, A. N. M., & De Vries, T. J. (1997). Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of the pretreatment regimen. *Psychopharmacology*, *131*(2), 115-122.
- Vanhoutte, P., & Bading, H. (2003). Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Current Opinion in Neurobiology*, *13*(3), 366-371.
- Verma, A., Bennett, J., Ayse Merve, Ö., Elena, P., & Brian, R. (2019). Cocaine addicted to cytoskeletal change and a fibrosis high. *Cytoskeleton*, *76*(2), 177-185.
- Vezina, P., Lorrain, D. S., Arnold, G. M., Austin, J. D., & Suto, N. (2002). Sensitization of the Midbrain Dopamine Neuron Reactivity Promotes the Pursuit of Amphetamine. *The Journal of Neuroscience*, *22*(11), 4654-4662.
- 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 Research*, *516*(1), 99-106.
- Vialou, V., Robison, A. J., Laplant, Q. C., Covington, H. E., Dietz, D. M., Ohnishi, Y. N., Mouzon, E., Rush, A. J., Watts, E. L., Wallace, D. L., Íguez, S. D., Ohnishi, Y. H., Steiner, M. A., Warren, B. L., Krishnan, V., Bolões, C. A., Neve, R. L., Ghose, S., Berton, O., ... Nestler, E. J. (2010).  $\Delta$ fosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nature Neuroscience*, *13*(6), 745-752.
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Baler, R., & Telang, F. (2009). Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, *56*, 3-8.
- Volkow, N. D., Wise, R. A., & Baler, R. (2017). The dopamine motive system: Implications for drug and food addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(12), 741-752.
- Wang, X. Bin, Bozdagi, O., Nikitczuk, J. S., Zu, W. Z., Zhou, Q., & Huntley, G. W. (2008). Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(49), 19520-19525.
- Wang, H., Lu, F., Jin, I., Udo, H., Kandel, E. R., Vente, J. De, Walter, U., Lohmann, S. M., Hawkins, R. D., & Antonova, I. (2005). Presynaptic and Postsynaptic Roles of NO, cGK, and RhoA in Long-Lasting Potentiation and Aggregation of Synaptic Proteins. *Neuron*, *45*(2001), 389-403.
- Wang, Y., Dong, Q., Xu, X. F., Feng, X., Xin, J., Wang, D. D., Yu, H., Tian, T., & Chen, Z. Y. (2013). Phosphorylation of cofilin regulates extinction of conditioned aversive memory via AMPAR

- trafficking. *Journal of Neuroscience*, 33(15), 6423-6433.
- Wang, Z., Edwards, J. G., Riley, N., Provance, D. W., Karcher, R., Li, X. dong, Davison, I. G., Ikebe, M., Mercer, J. A., Kauer, J. A., & Ehlers, M. D. (2008). Myosin Vb Mobilizes Recycling Endosomes and AMPA Receptors for Postsynaptic Plasticity. *Cell*, 135(3), 535-548.
- Weeks, J. R. (1962). Experimental Morphine Addiction: Method for Automatic Intravenous Injections in Unrestrained Rats. *The Journal of the American Medical Association*, 183(9), 215-217.
- White, F. J., & Kalivas, P. W. (1998). Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug and Alcohol Dependence*, 51(1-2), 141-153.
- White, F. J., & Wang, R. Y. (1984). Electrophysiological evidence for A10 dopamine autoreceptor subsensitivity following chronic d-amphetamine treatment. *Brain Research*, 309(2), 277-282.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313(5790), 1093-1097.
- Wise, R. A., & Bozarth, M. A. (1987). A Psychomotor Stimulant Theory of Addiction. *Psychological Review*, 94(4), 469-492.
- Wolf, M. E. (2010). Regulation of AMPA receptor trafficking in the nucleus accumbens by dopamine and cocaine. *Neurotoxicity Research*, 18(3-4), 393-409.
- Wolf, M. E., & Ferrario, C. R. (2010). AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(2), 185-211.
- Wolf, M. E., & Tseng, K. Y. (2012). Calcium-permeable AMPA receptors in the VTA and nucleus accumbens after cocaine exposure: When, how, and why?. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(72), 1-27.
- Wolf, M., Zimmermann, A. M., Görlich, A., Gurniak, C. B., Sassoè-Pognetto, M., Friauf, E., Witke, W., & Rust, M. B. (2015). ADF/Cofilin controls synaptic actin dynamics and regulates synaptic vesicle mobilization and exocytosis. *Cerebral Cortex*, 25(9), 2863-2875.
- Wolffgramm, J., & Heyne, A. (1991). Social behavior, dominance, and social deprivation of rats determine drug choice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 38(2), 389-399.
- Yang, G., Pan, F., & Gan, W. B. (2009). Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*, 462(7275), 920-924.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., & Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*, 393(6687), 809-812.
- Yasuda, R., Nimchinsky, E. A., Scheuss, V., Polgruto, T. A., Oertner, T. G., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2004). Imaging calcium concentration dynamics in small neuronal compartments. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2004(219), 1-21.
- Yokel, R. A. (1987). Methods of Assessing the Reinforcing Properties of Abused Drugs. *Spring-Verlag*, 1-34.
- You, Z., Bi, G., Galaj, E., Kumar, V., Cao, J., Gadiano, A., Rais, R., Slusher, B. S., Gardner, E. L., Xi, Z., & Newman, A. H. (2018). Dopamine D 3 R antagonist VK4-116 attenuates oxycodone self-administration and reinstatement without compromising its antinociceptive effects. *Neuropsychopharmacology*, 116(November), 1-10.

- Yuen, E. Y., Liu, W., Karatsoreos, I. N., Ren, Y., Feng, J., McEwen, B. S., & Yan, Z. (2011). Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory. *Molecular Psychiatry*, *16*(2), 156-170.
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2001). MORPHOLOGICAL CHANGES IN DENDRITIC SPINES ASSOCIATED WITH LONG-TERM SYNAPTIC PLASTICITY. *Annual review of Neuroscience*, *24*, 89-1071.
- Zahm, D. S. (2000). An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *24*(1), 85-105.
- Zahm, D. S., & Brog, J. S. (1992). On the significance of subterritories in the «accumbens» part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*, *50*(4), 751-767.
- Zhang, H., Bi, G., Li, X., Li, J., Qu, H., Zhang, S., Li, C., Onaivi, E. S., Gardner, E. L., Xi, Z.-X., & Qing-Rong, L. (2015). Species Differences in Cannabinoid Receptor 2 and Receptor Responses to Cocaine Self-Administration in Mice and Rats. *Neuropharmacology*, *40*, 1037-1051.
- Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S., & Horwitz, A. F. (2005). A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *Journal of Neuroscience*, *25*(13), 3379-3388.
- Zhang, J., Zhang, L., Jiao, H., Zhang, Q., Zhang, D., Lou, D., Katz, J. L., & Xu, M. (2006). c-Fos facilitates the acquisition and extinction of cocaine-induced persistent changes. *Journal of Neuroscience*, *26*(51), 13287-13296.
- Zhao, J., Ying, L., Liu, Y., Liu, N., Tu, G., Zhu, M., Wu, Y., Xiao, B., Ye, L., Li, J., Guo, F., Zhang, L., Wang, H., & Zhang, L. (2019). Different roles of Rac1 in the acquisition and extinction of methamphetamine-associated contextual memory in the nucleus accumbens. *Theranostics*, *9*(23), 7051-7071.
- Zhou, Q., Homma, K. J., & Poo, M. M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, *44*(5), 749-757.
- Zhou, Q., Xiao, M., & Nicoll, R. A. (2001). Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(3), 1261-1266.
- Zhou, Z., Meng, Y., Asrar, S., Todorovski, Z., & Jia, Z. (2009). A critical role of Rho-kinase ROCK2 in the regulation of spine and synaptic function. *Neuropharmacology*, *56*(1), 81-89.
- Zimmer, B. A., Dobrin, C. V., & Roberts, D. C. S. (2011). Brain-cocaine concentrations determine the dose self-administered by rats on a novel behaviorally dependent dosing schedule. *Neuropsychopharmacology*, *36*(13), 2741-2749.
- Zimmer, B. A., Oleson, E. B., & Roberts, D. C. S. (2012). The motivation to self-administer is increased after a history of spiking brain levels of cocaine. *Neuropsychopharmacology*, *37*(8), 1901-1910.
- Zimmermann, A. M., Jene, T., Wolf, M., Görlich, A., Gurniak, C. B., Sassoè-Pognetto, M., Witke, W., Friauf, E., & Rust, M. B. (2014). Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder-like Phenotype in a Mouse Model with Impaired Actin Dynamics. *Biological Psychiatry*, *78*(2), 95-106.