

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Participación de Cdk5 como modulador de la morfogénesis
de espinas dendríticas inducidas por la acción de
psicoestimulantes**

por

Biol. Soledad Ferreras

Directora: Dra. María Gabriela Paglini

Instituto de Investigación Médica Mercedes y
Martín Ferreyra. INIMEC-CONICET-UNC



Córdoba, Argentina

2014

COMISIÓN ASESORA

Dra. María Gabriela Paglini	Instituto de Investigación Médica "Mercedes y Martín Ferreyra" INIMEC- CONICET-UNC.
Marta Cristina Antonelli	Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof .E. De Robertis" IBCN-CONICET-UBA.
Daniel Hugo Mascó	Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

*A mi mamá, mi papá,
a Lola y José.*

Agradecimientos

Esta tesis no hubiese sido posible sin la colaboración, ayuda y apoyo de un sin fin de personas que detallo a continuación , a quienes les estoy profunda y sinceramente agradecida:

- A mi mamá, Heidi, quien siempre me apoyó incondicionalmente en mis decisiones y me alentó en momentos claves. A mis hermanas Xime y Lucre, por estar siempre presentes. A mi abuela Chiquita, por su apoyo. A Sergio B, por tu inmensa generosidad y cariño. A Marina y Dante, también muchas gracias por su cariño. Los quiero mucho a todos.
- A mi José y mi Lolita, sin duda no hubiese sido posible estar aquí sin su presencia. Por soportarme en momentos en los que ni yo me aguantaba... por compartir los pequeños logros y por ayudarme a superar los momentos amargos, por toda la felicidad que me brindan. Los amo..
- A Dana W por tu ayuda, cariño y la paz que transmitís. A toda la familia Wojnacki gracias por su apoyo y paciencia. Los quiero mucho.
- A mi directora de Tesis, la Dra. María Gabriela Paglini, por abrimé las puertas de su laboratorio, por sus enseñanzas tanto a nivel académico como personal, por las largas horas de discusión de experimentos, por escucharme, por ayudarme a mejorar, por su apoyo a lo largo de estos años tanto en lo académico como en lo personal, por su generosidad, por confiar en mí y por todo su cariño. Gracias por el hermoso laboratorio que creaste.
- Al Dr. Lucas Pozzo-Miller quien generosamente no solo me abrió las puertas de su laboratorio, donde pude realizar gran parte de los experimentos presentados en esta tesis, sino también me dejó conocer a su familia quienes me brindaron todo su afecto y contención. Muchas gracias, y en especial a su esposa Karina. Con el cariño de la familia Pozzo-Miller Birmingham se sintió como un segundo hogar.
- A la comisión asesora de tesis, Dra. Marta Antonelli y Daniel Mascó, por el seguimiento, sugerencias y discusiones científicas durante la realización de este

trabajo.

- A los miembros del tribunal, especialmente a la Dra. Cambiasso, por las correcciones y sugerencias realizadas a este manuscrito.
- A mis compañeros de laboratorio, que poca gente tiene la dicha de encontrar AMIGOS mas que compañeros, y yo tengo la suerte de que sea así y además las personas mas hermosas. Favio Krapacher, Viqui Pisano, Guille Fernandez, Dami Revillo, Carlos Arias, Eve Cotella. Gracias por todo el apoyo, por la ayuda INFINITA tanto a nivel científico como personal, por compartir el día a día conmigo, por los mates, por los consejos, por la discusión de resultados o experimentos, por soltarme una sonrisa cuando lo necesitaba y cuando no también, por alentarme, por las tardes after-lab, por los hermosos recuerdos que me llevo. Realmente los quiero mucho. Especialmente gracias por:

Carlitos gracias por las largas horas de ayuda estadística, Guillermi gracias gracias por la gran ayuda que me diste con los experimentos terminando blots, etc; Favito gracias por tu generosidad y discusión de experimentos y por compartir tu sabiduría, Viqui gracias por la gran ayuda en las épocas de virológico hubiese sido muy distinto sin vos, Damiau gracias por escuchar tantas horas de discusión de resultados, Eve gracias por los consejos experimentales y por las discusiones de resultados.

- A mis amigos del instituto Pepi Castello, Franquito Mir, Bela Palandri, Gon Quasollo, Lu Masseroni, Viqui Rozes, Lau G, Cris gracias se los quiere muchísimo! Les brindaron mucho color a todos estos años.
- Especial agradecimiento a Lujan Masseroni, quien realizó gran parte de los cultivos disociados de hipocampo.
- A tanta gente linda que trabaja o trabajó en el instituto Ferreyra: Laura Gastaldi, Cristina Arias, Mónica Sanchez, Monica Remedi, Mariano, Ana Vivineto, María Jose Virgolini, Constanza Feliziani, Ceci Vranich, Flor Sanchez, Gimena Farias, Pablo Helguera, Fabiola Macchioni, Daniel Raimunda, Nico Unsain, etc....
- A Mariano Bisbal, quien me enseñó y ayudó a diseñar el plásmido p25 y el siCdk5.

- Al laboratotio del Dr. Cáceres, especialmente a Laura Gastaldi y Mónica Remedi, por toda su ayuda, aclaración de dudas y enseñanzas de técnicas.
- A la Dra. Soledad De Olmos, quien me brindó todo su apoyo técnico como así también largas horas de conversación.
- A Victor Danelon por su colaboración en los últimos experimentos de esta tesis y a Laura Montrull.
- A la Dra. Mariana Bollo y Dra. Cecilia Vranich, gracias por su colaboración y por los reactivos prestados para experimentos de ensayos de la actividad de Pak que por algunos inconvenientes, no han podido ser incluidos en la tesis.
- A Cecilia Mlewski, que gracias a ella ingrese al laboratorio y por enseñarme diversas técnicas.
- A todo el personal del Bioterio del Instituto Ferreyra por su gran trabajo y su buena onda, ninguna tesis seria posible sin su labor.
- A todo el personal, actual y pasado del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, por toda su ayuda y buena predisposición durante el desarrollo de este trabajo.
- Un especial agradecimiento al Dr. Gastón Calfa y Dr. Chris Chapleau quienes me enseñaron las técnicas que desarrolle en el laboratorio del Dr. Pozzo-Miller.
- Al instituto de Virología y su gente especialmente a Pedro Gil.
- A la Universidad Nacional, por ser libre y gratuita.

Listado de Publicaciones Derivadas de la Tesis

Los siguientes manuscritos se encuentran en preparación:

- Cdk5/p25 is essential for maintaining mature dendritic spines generated by amphetamine in hippocampal pyramidal neurons.
Ferreras, S., Fernandez, G., Masseroni, L., Pisano, M.V., Krapacher, F. A., Chapleau, C., Mlewski, C., Arias, C., Pozzo-Miller, L., Paglini, G.
- TrkB and Cdk5 are required for Amphetamine-induced spinogenesis in hippocampal pyramidal neurons.
Ferreras, S., Danelon, V., Fernandez, G., Pozzo-Miller, L., Masco, D., Paglini, G.

Indice

COMISIÓN ASESORA.....	2
Agradecimientos.....	4
Listado de Publicaciones Derivadas de la Tesis.....	7
Lista de Abreviaturas.....	12
Resumen.....	15
Summary.....	16
Introducción.....	17
1.1 Plasticidad Sináptica.....	17
1.1.1 Plasticidad Sináptica Estructural y Funcional.....	17
1.1.2 Espinas Dendríticas.....	18
1.1.2a Estructura de las Espinas Dendríticas.....	18
1.1.2b Composición de las Espinas Dendríticas.....	20
1.1.3 Espinogénesis: Tres Posibles Modelos.....	26
1.2 Plasticidad Sináptica Asociada a la Exposición a Drogas de Abuso.....	28
1.2.1 Las Drogas de Abuso.....	30
1.2.2 Anfetamina.....	31
1.2.3 Modo de Acción.....	31
1.2.4 Dopamina y su Transportador.....	33
1.2.5 Receptores de Dopamina.....	35
1.2.6 Inervación Dopaminérgica y Localización de Receptores.....	37
1.2.7 Señalización Dopaminérgica.....	38
1.2.8 Circuitos Neuronales Importantes que Intervienen en la Adicción a Drogas...39	
1.3 Quinasa Dependiente de Ciclina 5.....	42
1.3.1 Regulación de Cdk5.....	43
1.3.2 Localización Subcelular de Cdk5.....	45
1.3.3 Funciones de Cdk5.....	46
1.3.4 Cdk5 y Drogas de Abuso.....	52
1.4 Construcción de la Hipótesis.....	54
Objetivos.....	56
2.1 Objetivo general.....	56

2.2 Objetivos específicos.....	56
Materiales y Métodos.....	57
3.1 Animales de Experimentación.....	57
3.1.1 Genotipificación de Ratones Transgénicos Thy1-EGFP.....	57
3.1.2 Obtención de la Muestra de Tejido.....	58
3.1.3 Extracción y purificación del ADN genómico.....	58
3.1.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	59
3.2 Cultivos Primarios Hipocampales.....	60
3.2.1 Cultivo Organotípico de Hipocampo.....	60
3.2.2 Cultivo de Neuronas de Hipocampo Disociadas.....	60
3.3 Transfecciones.....	62
3.3.1 Transfecciones de Cultivos Organotípicos de Hipocampo: Biolística.....	62
3.3.2 Transfecciones de Cultivos de Neuronas de Hipocampo Disociadas.....	62
3.3.3 Plásmidos Utilizados.....	63
3.4 Fijación.....	63
3.4.1 Fijación de los Cultivos.....	63
3.4.2 Fijación de los Cerebros.....	64
3.5 Drogas y Tratamientos Farmacológicos.....	64
3.6 Adquisición y análisis de imágenes.....	65
3.7 Análisis bioquímicos.....	66
3.7.1 Preparación de la Fracción Sinaptosomal.....	66
3.7.2 Preparación de las Muestras para Homogenato Total.....	67
3.7.3 Análisis de Western Blot.....	68
3.7.4 Anticuerpos.....	69
3.8 Procedimientos.....	69
3.8.1 Experimentos ex vivo: Cultivos Organotípicos de Hipocampo.....	69
3.8.2 Experimentos in vitro: Cultivo Primario de Neuronas de Hipocampo.....	70
3.8.3 Experimentos in vivo: Protocolo de dos Inyecciones.....	70
3.9 Análisis Estadístico.....	71
Resultados.....	72
4.1. Morfogénesis de Espinas Dendríticas Inducidas por Anfetamina en Neuronas Piramidales de Hipocampo.....	72
4.1.1a Una sola Dosis de Anfetamina es Suficiente para Generar Espinas Dendríticas	

en Neuronas Piramidales de CA1.....	73
4.1.1b Caracterización Morfológica de las Espinas Dendríticas.....	74
4.1.2 Morfogénesis de Espinas Dendríticas Inducidas por la Acción de Anfetamina en Cultivos Organotípicos de Hipocampo.....	76
4.1.2a Efecto Espinogénico Provocado por la Acción de Anfetamina en Dendritas Apicales de Neuronas Piramidales de CA1 y CA3 Provenientes de Cultivos Organotípicos de Hipocampo.....	77
4.1.2b Caracterización Morfológica de la Espinogénesis Inducida por Anfetamina, en Cultivos Organotípicos de Hipocampo.....	79
4.1.3 El Tratamiento con Anfetamina Promueve la Generación de Espinas Dendríticas en Cultivos Disociados de Neuronas Piramidales de Hipocampo.....	80
4.2.1 Caracterización de los Niveles de Expresión de Cdk5, p35, DAT y PSD95.....	82
4.2.2a La inhibición de la Función de Cdk5 Previene el Aumento de Espinas Dendríticas Inducidas por Anfetamina en Cultivos Organotípicos de Hipocampo.....	84
4.2.2b Caracterización Morfológica de las Espinas Dendríticas bajo la Inhibición de Cdk5, en Cultivos Organotípicos de Hipocampo.....	86
4.2.3 Participación de los Activadores de Cdk5, p35 y p25, en la Morfogénesis de Espinas Dendríticas Inducida por la Acción de Anfetamina.....	87
4.2.3a Cdk5 Modula la Espinogénesis Inducida por Anf a través de su Activador Específico p25.....	88
4.2.3b Caracterización Morfológica de las Espinas Dendríticas.....	89
4.4 Participación de Pak como Efector de Cdk5 en la Espinogénesis Inducida por Anfetamina.....	91
4.4.1a Efecto de la Activación e Inhibición de Pak sobre la Densidad de Espinas dendríticas Inducidas por Anfetamina.....	91
4.4.1b Caracterización Morfológica de las Espinas Dendríticas.....	93
¿Y ahora como seguimos? ¿Cómo se están generando las espinas inducidas por Anfetamina?.....	94
4.5 Determinación de la Participación de BDNF en la Generación de Espinas Dendríticas Inducidas por Anfetamina.....	94
4.5.1 Caracterización del Efecto Espinogénico Inducido por la Exposición a Tiempos	

Cortos de Anfetamina, en Cultivos Disociados de Hipocampo.....	95
4.5.2a Determinación de la Participación de BDNF en el Efecto Espinogénico Inducido por Anfetamina, en Cultivos disociados de Neuronas Hipocampales.....	96
4.5.2b Caracterización Morfológicas de las Espinas Dendríticas de Neuronas Provenientes de Cultivos Disociados de Hipocampo.....	98
4.5.3 Análisis de la Expresión de Proteínas Relacionadas a la Plasticidad Sináptica, en Cultivos de Neuronas Disociadas de Hipocampo.....	99
4.5.4 Análisis de la Expresión de Proteínas Relacionadas a la Plasticidad Sináptica, en Ratones Administrados con un Protocolo de Dos Inyecciones.....	101
Discusión.....	104
5.1 Morfogénesis de espinas dendríticas inducidas por anfetamina.....	105
5.1.1 In vivo.....	105
5.1.2 “Ex vivo” e “In vitro”	107
5.2. Participación de Cdk5 y sus activadores específicos, p35 y p25, en la espinogénesis inducida por anfetamina.....	111
5.3 Participación de Pak como efector de Cdk5 en la espinogénesis inducida por anfetamina.....	118
5.4 Participación de BDNF en la génesis de espinas dendríticas inducidas por anfetamina.....	122
Conclusiones.....	127
Bibliografía.....	130

Lista de Abreviaturas

Abp 1: proteína de unión a la actina 1
ADF/cofilina: factor depolimerizante de la actina/cofilina
ALS: esclerosis lateral amiotrófica
AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazo-propionato
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
Anf: anfetamina
ANOVA: análisis de la varianza
BDNF: factor trófico derivado de cerebro
CamKII: quinasa calmodulina dependiente de calcio II
CCNI: Ciclina I
Cdk5: quinasa dependiente de ciclina 5
Cdk5: quinasas dependientes de ciclina
Cpf: corteza prefrontal
CRMP1: proteína de unión a la tubulina mediadora de respuesta de colapso proteína 1
DA: dopamina
DARPP-32: fosfoproteína regulada por AMPc y dopamina, PM \sim 32 kD
DAT: transportador de dopamina
DIV: día in vitro
DN-Cdk5: mutante dominante negativa de Cdk5
EphA4 : receptor efrina 4 tipo A
eGFP: proteína fluorescente verde aumentada
ERK: quinasa regulada por señales extracelulares
eYFP: proteína fluorescente amarilla aumentada
F-actina: actina filamentosa
FC: fracción citoplasmática
FS: fracción sinaptosomal cruda

G-actina: actina globular
GABA: ácido γ -aminobutírico
GAPs: Proteínas Activadoras de la Actividad GTPasa
GDP: guanosina difosfato
GEFs: Factores de Intercambio de Nucleotidos
GPCR: proteínas G transmembrana
GSTP1: glutathion S transferasa P
GTP: guanosina trifosfato
HT: homogenato total
i.p.: inyecciones intraperitoneales
LTP: Potenciación a largo plazo
MAGUK: proteína asociada a membrana guanilato quinasa
MAO: monoamina oxidasa
MAPK: proteína quinasas activadas por mitógenos
MEF2: factor potenciador de miocitos 2
MLC: cadena liviana reguladora de miosina II
N-WASP: proteína del síndrome neural Wiskott-Aldrich
NAC: Núcleo Acumbens
NEM: neuronas espinosas medias
NGF: factor de crecimiento neural
NMDA: N-metil-d-aspartato
Pak-CA: constructo constitutiva activa de Pak
Pak-KD: constructo quinasa deficiente de Pak
Pak: quinasa activada p21
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDI: protocolo de dos inyecciones
PI3K: quinasa de fosfoinositol 3
PKA: proteína quinasa A
PKC: proteína quinasa C

PP1: proteína fosfatasa 1
PSD: Densidad post-sináptica
pTrkB: receptor TrkB fosforilado en sus tirosinas de activación
rD: receptores de Dopamina
REL: Retículo endoplásmico liso
Rosco: Roscovitine
Sal: Solución salina
siCdk5: ARN pequeño de interferencia para Cdk5
SN: sustancia nigra pars compacta
SNC: Sistema Nervioso Central
SynCAM : molécula de adhesión celular 1
TBS: buffer tris salino
TH: tirosina hidroxilasa
Trk: Familia de receptores de factores tróficos cerebrales
VDCCs: canales de Ca^{+2} dependiente de voltaje
Veh: Vehículo
VMAT-2: transportador vesicular de monoaminas tipo 2
VTA: área tegmental ventral
WAVE-1: proteína 1 homologa a la familia WAS verprolina
WT: salvaje

Resumen

Actualmente no existen dudas que los cambios a nivel del comportamiento y de la funciones fisiológicas inducidas por experiencias, como aquellas asociadas al aprendizaje y a la memoria, involucra la reorganización de las conexiones sinápticas -plasticidad estructural- en circuitos relevantes del cerebro. Uno de los ejemplos más contundentes son los que ocurren durante el desarrollo de la adicción a drogas de abuso. El estudio de la plasticidad sináptica estructural inducida por psicoestimulantes ha sido clásicamente estudiada en áreas del circuito de recompensa, ricas en inervaciones dopaminérgicas, dejando de lado otras áreas límbicas, como el hipocampo y que también participa en este proceso. Un blanco de dicha plasticidad estructural son las espinas dendríticas, las cuales son protrusiones ricas en actina, altamente dinámicas y constituyen el sitio donde reside la plasticidad estructural dependiente de experiencias o estímulos. Varios estudios sugieren que Cdk5 juega un rol importante en el proceso de plasticidad sináptica y adicción. Es por ello que en el presente trabajo nos propusimos indagar acerca de la participación de Cdk5 y sus activadores como modulador de estos procesos plásticos.

En esta tesis demostramos que el tratamiento con anfetamina (Anf) a animales juveniles, en un nuevo contexto, provoca la generación de espinas dendríticas en el hipocampo. Asimismo, fuimos los primeros en replicar dicho efecto en cultivos de hipocampo tanto en condiciones “in vitro” como “ex vivo”. A partir de la utilización de diferentes estrategias, demostramos que es necesario que Cdk5 esté activa y a su vez regulada por p25 para que dicho fenómeno se desarrolle. Mediante experimentos de sobre-expresión de las formas quinasa inactiva y activa de Pak, proteína implicada en la regulación de la dinámica de actina y sustrato de Cdk5, mostramos su participación en el mantenimiento de la espinogénesis inducida por Anf. Finalmente, resultados preliminares sugieren que la señalización a través de TrkB estaría involucrada en este proceso.

Dado el aumento en el consumo de estimulantes y considerando lo poco que se conoce sobre las respuestas neuroadaptativas frente a estos agentes, es importante conocer los mecanismos moleculares y celulares involucrados en el proceso de adicción, para así desarrollar terapias más eficientes en el tratamiento de dicha patologías.

Summary

Persistent changes in behavior and psychological function that occur as a function of experience, such those associated with learning and memory, are thought to be due to the reorganization of synaptic connections (structural plasticity) in relevant brain circuits. Some of the most compelling examples of experience-dependent changes in behavior and psychological function, changes that can last a lifetime, are those that accrue with the development of addictions.

Traditionally, psychostimulant-induced structural plasticity has been studied in brain regions related to reward, with high dopaminergic inputs, however these drugs also produce alterations in other areas associated with higher-order associative learning such as the hippocampus. One of the targets of such structural plasticity are dendritic spines, which are dynamic, actin-rich protrusions. Several studies suggest that Cdk5 plays an important role in the process of drug addiction and in synaptic plasticity. In the present study we propose to investigate the involvement of Cdk5 as a key and its activators as a modulator of these plastic processes.

Here we demonstrate an increase in dendritic spines density in a novel brain region: hippocampus, in young animals using a two-amphetamine-injections protocol in a novel context. Furthermore, we are the first to show that amphetamine treatment induces spinogenesis in primary hippocampal cultures under "*in vitro*" and "*ex vivo*" conditions. Using different strategies, we report the crucial involvement of Cdk5/p25 complex in this process. Since Pak is a Cdk5 effector and has been implicated in the regulation of actin dynamic, here we demonstrate its participation in the maintenance of amphetamine-induced spinogenesis, through the over-expression of constitutive-active and kinase-death Paks mutants. Finally preliminary results suggest that signaling through TrkB receptor, would be involved in this process.

The understanding of the cellular and molecular mechanisms underlying drug addiction is of great importance to develop more effective treatments for these disorders.

1

Introducción

1.1 Plasticidad Sináptica

1.1.1 Plasticidad Sináptica Estructural y Funcional

La habilidad del Sistema Nervioso Central (SNC) para llevar a cabo funciones como la memoria y el aprendizaje, se debe a la maleabilidad de su principal unidad de procesamiento: “la sinapsis neuronal”. En este sitio, la liberación de neurotransmisores desde la membrana pre-sináptica provoca la activación de receptores en la membrana post-sináptica, desencadenando la activación de complejas vías de señalización intracelulares en la neurona post-sináptica. El estado fisiológico de las neuronas puede alterarse a través de la modulación de dichas vías de señalización, modificando de este modo la eficiencia sináptica (Kolb y Wishaw 1998; Rampon et al. 2000; Horner 1993; Rusakov et al. 1996; Nimchinsky et al. 2002; Tsay y Yuste 2004) en otras palabras, haciendo a las neuronas más o menos sensibles al estímulo por el neurotransmisor. El proceso mediante el cual una sinapsis puede ser fortalecida o debilitada se lo conoce como **plasticidad funcional** y constituye un evento clave en la fisiología del SNC. Otra forma de plasticidad sináptica es la **plasticidad estructural**. Ésta consiste en la eliminación y/o generación de nuevos contactos sinápticos, lo cual conlleva a cambios en los circuitos neuronales y en la conectividad neuronal.

Trabajos basados principalmente en el estudio de la morfología de las dendritas y de sus espinas, han establecido que aproximadamente el 90 % de las sinapsis excitatorias son llevadas a cabo sobre espinas dendríticas; y la sinaptogénesis asociada con experiencias tales como el aprendizaje y la memoria, son reflejadas tanto en cambios en

el número como en la forma de las espinas dendríticas, lo que lleva a modificar la eficiencia sináptica (Kolb y Whishaw 1998; Tsay y Yuste 2004; Nimchinsky et al. 2002; Horner 1993) . Así, dendritas y espinas dendríticas constituyen el sitio donde reside la plasticidad estructural dependiente de experiencias o estímulos (Harris y Kater 1994; Nimchinsky et al. 2002; Kasai et al. 2003; Bourne y Harris 2008).

1.1.2 Espinas Dendríticas

Las espinas dendríticas fueron descritas por primera vez en 1888 por Santiago Ramón y Cajal utilizando para su visualización un protocolo de impregnación de plata desarrollado por Camillo Golgi. Las espinas son pequeñas proyecciones dendríticas, morfológicamente dinámicas y ricas en actina, de longitudes que varían desde 0,2 hasta 3 μm y volúmenes de 0,001 a 1 μm^3 . Esta diversidad morfológica y el hecho de ser pequeñas proyecciones de la dendrita, es sumamente ventajoso para la neurona ya que permite alojar mas sinapsis por neurita. Así, la densidad de espinas dendríticas puede variar de 1 a 10 espinas por cada micrómetro dendrítico y algunas neuronas, como las hipocámpales, contienen miles de espinas a lo largo del su árbol dendrítico (Sorra y Harris 2000).

Hasta el momento, no se ha observado la presencia de espinas dendríticas en neuronas inmaduras. Éstas neuronas presentan en sus dendritas muchas proyecciones sin cabeza, llamadas “filopodios”. Los filopodios recién formados, carecen de la maquinaria post-sináptica necesaria para el correcto funcionamiento de la sinapsis. En ciertas circunstancias, cuando el cerebro recibe información y a medida que avanza el desarrollo y madurez de la neurona, el número de filopodios disminuye y aumenta la densidad de espinas (Sekino et al. 2007).

1.1.2a Estructura de las Espinas Dendríticas

La estructura de las espinas consta de tres dominios básicos: (1) una cabeza bulbosa que es la encargada de hacer contacto con el axón y alberga en su interior a la densidad post-sináptica (PSD, por sus siglas del inglés), (2) una base en la unión con el eje

de la dendrita y (3) un angosto cuello que vincula la cabeza con la base de la espina y cumple la función de aislar y restringir la difusión de moléculas de señalización post-sinápticas del resto de la dendrita, protegiéndola de eventos de excito-toxicidad (Newpher y Ehlers 2009)(fig. 1). Una forma simple de clasificar las espinas según su morfología, se basa en la relación entre la constricción de su cuello y en el tamaño de su cabeza quedando agrupadas en tres categorías: “**tipo III**” o “**thin**” (**thin**, del inglés) que poseen un estrecho cuello y una pequeña cabeza; las “**tipo II**” o “**mushroom**” (**mushroom**, del inglés) que poseen un cuello corto y una cabeza relativamente grande; y las “**tipo I**” o “**stubby**” (“**stubby**”, del inglés) que no poseen cuello (Sekino et al. 2007; Harris et al. 1992). Estas características proveen rasgos distintivos a cada tipo de espina, los cuales pueden ser medidos y podrían estar reflejando diferentes historias funcionales de las espinas dendríticas. Así, las espinas “mushroom” son consideradas como las más estables y el tipo de espina menos plástico. Presentan PSD más grandes y complejas con una mayor densidad de receptores glutamatérgicos (Harris et al. 1992; Matsuzaki et al. 2001; Nicholson-Dykstra et al. 2005; Golden y Russo 2012). Las espinas “stubby”, son las más abundantes durante el desarrollo, se las considera como estructuras plásticas que se encuentran fuertemente acopladas al eje dendrítico (Schmidt y Ehlers 2009); por lo que los cambios en la densidad de espinas “stubby” pueden impactar de manera desproporcional, la excitabilidad neuronal en comparación a otros tipos de espinas. Además se cree que la falta de un cuello evita las conexiones inhibitorias (Noguchi et al. 2005). Las espinas del tipo “thin” son consideradas como estructuras plásticas e inmaduras.

Por otro lado, las espinas más grandes tienen mayor probabilidad de contener retículo endoplásmico liso (REL) (Spacek y Harris 1997), polirribosomas (Ostroff et al. 2002; Bourne y Harris 2007), compartimiento endosomal (Cooney et al. 2002) y astrogliá perisináptica (Witcher et al. 2007). Estos rasgos sugieren que las espinas más grandes serían funcionalmente más fuertes en su respuesta a glutamato, en la regulación local del calcio intracelular, en el reciclado endosomal, en la traducción y degradación de proteínas y en la interacción con la astrogliá. Las espinas más pequeñas serían más flexibles, pudiendo alargarse o encogerse más rápidamente en respuesta a subsecuentes

activaciones (Bourne y Harris 2007). Sin embargo, cabe destacar que las espinas son estructuras dinámicas que pueden variar su morfología rápidamente, sobretodo en el desarrollo, y además existe una distribución continua de formas geométricas de espinas, por lo cual dicha categorización en tres tipos morfológicos, debe ser considerada como una fotografía instantánea arbitraria de un sinfín de tipos de morfológicos de espinas dendríticas (Chapleau y Pozzo-Miller 2008).

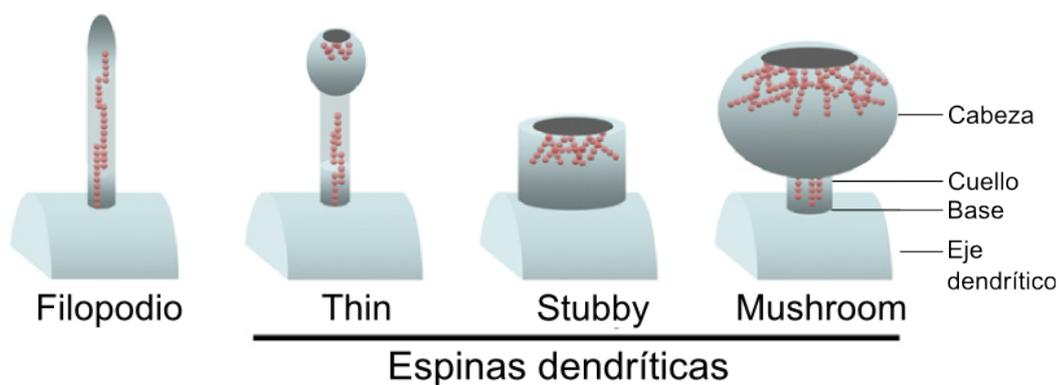


Figura 1. Morfología del filopodio y de las espinas dendríticas. Representación esquemática de las morfologías de filopodio y de tres tipos de espinas dendríticas: espinas del tipo “thin”, espinas del tipo “stubby” y espinas del tipo “mushroom”. Los disco grises representan la PSD y las cadenas de círculos rojos representan la actina filamentososa. Modificado de Sekino y colaboradores, 2007.

1.1.2b Composición de las Espinas Dendríticas

- **Densidad Post-sináptica**

La cabeza de las espinas provee un sitio bioquímico donde los iones y las moléculas de señalización se concentran luego de la activación sináptica. La PSD es un engrosamiento electro-denso en la cabeza de las espinas y funciona como una estructura organizadora donde recluta receptores como: N-metil-d-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazo-propionato (AMPA) y receptores de glutamato metabotrópicos, proteínas de adhesión, proteínas de anclaje como PSD-95 (proteína de la densidad pos-sináptica de peso molecular 95) y proteínas de señalización como la quinasa calmodulina dependiente de calcio II (CamKII), entre otras (Okabe 2007).

Adyacente a la PSD se encuentra una zona endocítica, la cual es una porción de membrana estable donde se produce la endocitosis dependiente de clatrina para el reciclado de receptores post-sinápticos (Blanpied et al. 2002). La principal función de ésta zona es capturar y reciclar el pool sináptico móvil de receptores, como lo es para los del tipo AMPA, requeridos para la potenciación a largo plazo (LTP, siglas del inglés “long term potentiation”) (Petrini et al. 2009). Un interesante mecanismo para regular la morfología de las espinas es la incorporación o remoción de membrana sináptica y el recambio de receptores post-sinápticos (Sekino et al. 2007).

- **Endosomas de Reciclado**

Ha sido reportado que la morfología de las espinas es modelada en parte, por la actividad del sistema de endosomas de reciclado, ya que el bloqueo de dicho sistema resulta en una disminución del número de espinas (Park et al. 2006). Por otra parte, para el desarrollo del LTP se requiere de la inserción de receptores AMPA mediada por exocitosis (Lu et al. 2001; Park et al. 2004) junto con la endocitosis de las subunidades de canales de K⁺ dependientes de voltaje del tipo A (Kv4.2), aumentando localmente la excitabilidad dendrítica (Kim et al. 2007). Además cuando se interfiere con la internalización de los receptores AMPA se provoca una excito-toxicidad, ya que aumenta la sensibilidad al glutamato lo que conlleva a una eventual pérdida de espinas dendríticas (Hasbani et al. 2001). Por lo tanto, debe existir un fino balance entre la endo y la exocitosis, dependiente de la actividad, para responder de manera precisa.

- **Polirribosomas**

Las respuestas plásticas de las espinas dendríticas depende también de la habilidad de regular la síntesis o degradación de proteínas mediante el sistema de proteosomas. Steward y Levy (1982) demostraron que toda la maquinaria necesaria para sintetizar proteínas, como polirribosomas, se encuentra en la base de las espinas (para mayor información ver revisión Bourne y Harris 2008). Estos polirribosomas generalmente se redistribuyen preferencialmente a las cabezas de espinas mas grandes durante el LTP. Además, varios estudios observaron la presencia de retículo endoplásmico rugoso y

aparato de Golgi en las dendritas, donde podrían sintetizar y regular localmente la síntesis de proteínas (Cooney et al. 2002; Horton y Ehlers 2004; Grigston et al. 2005).

- **Retículo Endoplásmico Liso**

Ya hace 15 años desde la primera vez que se observó REL en las espinas dendríticas. Probablemente, esta organela participe en la regulación del calcio. La entrada de calcio a la neurona puede estimular la liberación de mayor cantidad de éste, desde el REL, provocando que el aumento de calcio se propague por toda la cabeza de la espina (Sabatini et al. 2001; Spacek y Harris 1997). A su vez, el calcio facilita el modelado del citoesqueleto de actina (Oertner y Matus 2005).

- **Mitocondrias**

Las mitocondrias rara vez se encuentran en las espinas dendríticas; sin embargo, están presentes abundantemente en el eje dendrítico. Probablemente, el ATP producido por estas organelas difunda desde el eje dendrítico hacia las espinas proveyendo de esta forma la energía necesaria para la traducción de señales mediadas por proteínas quinasas (Li et al. 2004; Bourne y Harris 2008).

- **Citoesqueleto de Actina**

La formación y la morfología de las espinas dendríticas se encuentra regulada por los filamentos de actina (Matus et al. 2000; Zito et al. 2004). La actina es una proteína globular de 43KD. La actina puede existir en forma monomérica (G-actina, del inglés *globular actin*) o bien, las diferentes subunidades se pueden ensamblar dando lugar a la formación de actina filamentosa también conocida como F-actina que cuenta con propiedades bioquímicas y biofísicas particulares. La transición de un estado a otro le confiere una gran flexibilidad y le permite participar de manera determinante en una gran variedad de procesos. Por esta razón, la célula regula la actina que tiene disponible así como el estado (G-actina o F-actina) en que se encuentra. Para ello, además de las propiedades de la molécula de actina y de los filamentos que conforma, cuenta con la colaboración de las proteínas que se unen a la actina (ABP del inglés *actin-binding proteins*) (Gungabissoon y Bamberg 2003; Nicholson-Dykstra et al. 2005; Fukata et al.

2003).

Numerosos estudios evidenciaron el importante papel que desempeña, en la morfogénesis de espinas dendríticas, la dinámica de actina y los mecanismos que regulan dicha dinámica. Además del “recambio rotatorio” de F-actina (del inglés “*Treadmilling*”), que es uno de los mecanismos propuestos de regulación de la dinámica de actina que propone que la tasa de adición de los monómeros en el extremo barbado de los microfilamentos es igual a la tasa de disociación en el extremo en punta, sin un aparente cambio en la longitud total del filamento (Wegner 1976), en las espinas dendríticas también son importantes otros procesos que regulan la dinámica de actina como: la nucleación que supone la formación de nuevos filamentos y el tráfico de pequeños filamentos de F-actina (Allison et al. 1998; Fischer et al. 2005; Fischer et al. 2000; Zhang y Benson 2001).

La organización de la actina en las espinas dendríticas varía según la sub-región de la misma, pero tanto su base, cuello y cabeza presentan una mezcla de distinta proporción de filamentos lineales y ramificados. El cuello de la espina presenta principalmente una red de pequeños y largos filamentos de actina ramificados mezclado con filamentos lineales, mientras que en la punta de la cabeza de las espinas se observa la mayor cantidad de filamentos de actina ramificados justo por debajo de la PSD (Korobova y Svitkina 2010)(fig.1). Los filamentos de actina en la cabeza de las espinas son muy dinámicos y presentan una alta tasa de recambio principalmente mediante recambio rotatorio de los filamentos de actina (Honkura et al. 2008).

A continuación se detallan las proteínas de unión a actina más comunes de las espinas dendríticas:

El *complejo Arp2/3*, se encuentra concentrado en espinas, el mismo se une a los costados de filamentos de actina ya existentes y provoca la nucleación de nuevos filamentos resultando en una red de actina más ramificada (Goley y Welch 2006). Este complejo ha sido implicado en la formación de la cabeza de las espinas dendríticas (Wegner et al. 2008; Hotulainen et al. 2009). Así mismo, la falta de alguno de sus activadores, como cortactina, WAVE-1 (proteína 1 homóloga a la familia WAS verprolina),

N-WASP (proteína del síndrome neural Wiskott-Aldrich) y Abp 1 (proteína de unión a la actina 1) provoca alteraciones en la densidad y morfología de las espinas dendríticas (Hering y Sheng 2003; Grove et al. 2004; Kim et al. 2006; Soderling et al. 2007; Wegner et al. 2008).

Profilina I y profilina II, son importantes en la polimerización de actina. Estas favorecen la incorporación de los monómeros de G-actina-ATP promoviendo el crecimiento del filamento (Pollard et al. 2000).

La *proteína capping*, cumple una importante función en el ensamblado de actina. Esta se une al extremo barbado (+) del filamento restringiendo su polimerización cuando ella no es requerida (Pollard y Borisy 2003).

El complejo *ADF/cofilina (factor depolimerizante de la actina/cofilina)* induce la depolimerización de los filamentos de actina desde su extremo en punta (-), provocando el aumento del "treadmillig". La acción del complejo ADF/cofilina es esencial para mantener el pool de monómeros de actina (Hotulainen et al. 2009; Hotulainen et al. 2005). En neuronas, cofilina 1 es necesaria para el correcto ciclado de actina y se la ha involucrado en la modulación de la morfología de espinas dendríticas (Hotulainen et al. 2009). Así mismo, cuando la quinasa LimK1, que regula negativamente a ADF/cofilina, es inhibida resulta en una alteración de la morfología de las espinas dendríticas (Meng et al. 2002).

Muchos receptores sinápticos como los receptores glutamatérgicos *NMDA* y *AMPA* intervienen en la dinámica de actina (Fischer et al. 2000). Los receptores NMDA regulan el citoesqueleto de actina de al menos dos formas (1) mediando el flujo de Ca^{+2} en la neurona post-sináptica, que modula la actividad de muchas proteínas de unión a actina, como la proteína quinasa $CaMKII\beta$ (Lisman et al. 2002) y (2) uniéndose directamente a proteínas de unión a actina o regulando otras proteínas. Asimismo, varios receptores tirosina quinasa participan en vías de señalización intracelulares que intervienen en la dinámica de actina, como los miembros de la familia de receptores de factores tróficos cerebrales (*Trk*), particularmente el receptor para el factor trófico derivado de cerebro (BDNF) (Menna et al. 2009; Lai et al. 2012). En este sentido, ha sido demostrado que la

estimulación por largos períodos de tiempo con BDNF, sobre cultivos organotípicos de hipocampo promueve la generación de espinas dendríticas, a través de la vía de señalización de las ERK (Alonso et al. 2004; Tyler y Pozzo-Miller 2001). Otras proteínas que también han sido involucradas en la morfogénesis de espinas dendríticas son las *moléculas de adhesión celular* (Yoshihara et al. 2009).

Otras proteínas importantes que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina son las pequeñas *Rho y Ras GTPasas*, incluyendo Rho A, Rac y Cdc42 (Raftopoulou y Hall 2004). Estas son proteínas de unión a nucleótidos guanina, que ciclan entre un estado activo, unido a guanosina trifosfato (GTP), y un estado inactivo, unido a guanosina difosfato (GDP) (Nobes y Hall 1994). Dicha característica, les confiere la capacidad de filtrar, amplificar y temporalizar las señales que ellas reciben. El ciclado entre estos dos estados funcionales está altamente regulado por dos juegos de proteínas: (1) Factores de Intercambio de Nucleotidos (GEFs, por sus siglas en inglés) que promueven el intercambio de GDP por GTP y por lo tanto activan a las Rho GTPasas; y (2) Proteínas Activadoras de la Actividad GTPasa (GAPs, por sus siglas en inglés) que estimulan la actividad GTPasa intrínseca de las Rho GTPasas. La hidrólisis del GTP a GDP y liberación de Pi provoca un cambio conformacional en los dominios de unión a los efectores, su liberación y por lo tanto una disminución en su actividad (Heasman y Ridley 2008). Como ejemplo de GEFs podemos mencionar: Tiam1, la cual activa específicamente a los miembros Rac-1, Rac-2 y Rac-3 de la subfamilia de Rac, mientras que el GEF Lfc activa a RhoA (Birkenfeld et al. 2008; Kunda et al. 2001). Otros GEFs son menos específicos con respecto a que Rho GTPasa activa, por ejemplo el GEF VAV1 que puede activar a RhoA, Rac-1 y Cdc42 (Heasman y Ridley 2008). Es importante destacar que cuando las Rho GTPasas se encuentran en su estado activo, se unen a sus moléculas efectoras e inician una cascada de eventos de señalización que median respuestas celulares, incluyendo la transcripción de genes y la reorganización del citoesqueleto de actina.

Distintos estudios demostraron que Rac promueve la formación de espinas dendríticas, a través de uno de sus efectores más caracterizados, la quinasa activada p21 (del inglés, Pak) (Luo et al. 1996; Zhang et al. 2003; Nakayama y Luo 2000), una de las

moléculas blanco de PAK involucrada en la regulación de la morfogénesis de espinas dendríticas, es la cadena liviana reguladora de miosina II (MLC, del inglés) (Zhang et al. 2005). Así mismo, Pak es capaz de fosforilar y activar a LimK, quien a su vez fosforila a ADF/cofilina inhibiéndola, hecho que tendería a estabilizar los filamentos de actina (Bourne y Harris 2008; Blanchoin et al. 2000). A su vez, estudios realizados con ratones transgénicos deficientes de LimK demostraron que estos animales presentan espinas dendríticas con una morfología anormal, como así también déficits en pruebas de aprendizaje espacial (Meng et al. 2002).

1.1.3 Espinogénesis: Tres Posibles Modelos

Existen diferentes hipótesis que explican como se generan las espinas dendríticas durante el desarrollo del sistema nervioso:

(1) El primer modelo, también llamado “Modelo de Sotelo” propone que no sería necesario un contacto sináptico para la formación de espinas dendríticas (Sotelo 1990). Este mecanismo ha sido observado en neuronas cerebelares de Purkinje, en donde se crean estructuras dendríticas con forma de espina a través de mecanismos intrínsecos, que no dependen del contacto axonal (Sotelo 1990).

(2) El segundo modelo o “Modelo de Miller/Peters” propone que las espinas se originan de sinapsis que se forman inicialmente en el eje dendrítico (Harris et al. 1992; Miller y Peters 1981). Esta idea surge de la observación de que la mayoría de las sinapsis en neuronas en desarrollo se establecen sobre el eje dendrítico y no en los filopodios (Harris et al. 1992). A medida que el circuito neuronal madura, el número de sinapsis en las espinas aumenta y disminuyen las sinapsis en el eje dendrítico. En definitiva, en este modelo es el filopodio axonal y no el dendrítico el que busca una región apropiada para establecer el contacto sináptico en el eje dendrítico.

(3) El último modelo, “el modelo del filopodio”, propone que las espinas dendríticas se originan a partir de un precursor: los *filopodios dendríticos*, los cuales predominan en las neuronas jóvenes en desarrollo. Una vez que estos filopodios hacen contacto sináptico (con la membrana pre-sináptica) maduran a espinas (Marrs et al. 2001; Ziv y Smith 1996).

Durante el desarrollo, las dendritas se encuentran densamente pobladas con estos filopodios, los cuales son sumamente dinámicos y presentan una vida media corta, de solo unos minutos. A medida que se forman las sinapsis, el número de filopodios disminuye mientras que el número de estructuras del tipo espinas aumenta, sugiriendo que los filopodios podrían ser los precursores de dichas espinas. Ziv y Smith (1996) observaron en cultivos disociados de hipocampo una secuencia de eventos, en donde un filopodio encuentra un axón, crea un contacto sináptico y sufre una transformación de filopodio a espina. Dicha transformación, involucra disminución en la motilidad y en su longitud junto con un engrosamiento de la parte distal del filopodio. En este modelo, la gran motilidad del filopodio estaría dirigida a sensar el espacio alrededor de la dendrita en busca de un sitio apropiado para hacer contacto con un axón. Ha sido demostrado que la liberación de glutamato promueve la extensión del filopodio sugiriendo que este podría ser un mecanismo de guía para el filopodio hacia el sitio de liberación de vesículas pre-sinápticas (Portera-Cailliau et al. 2003)(fig. 2.).

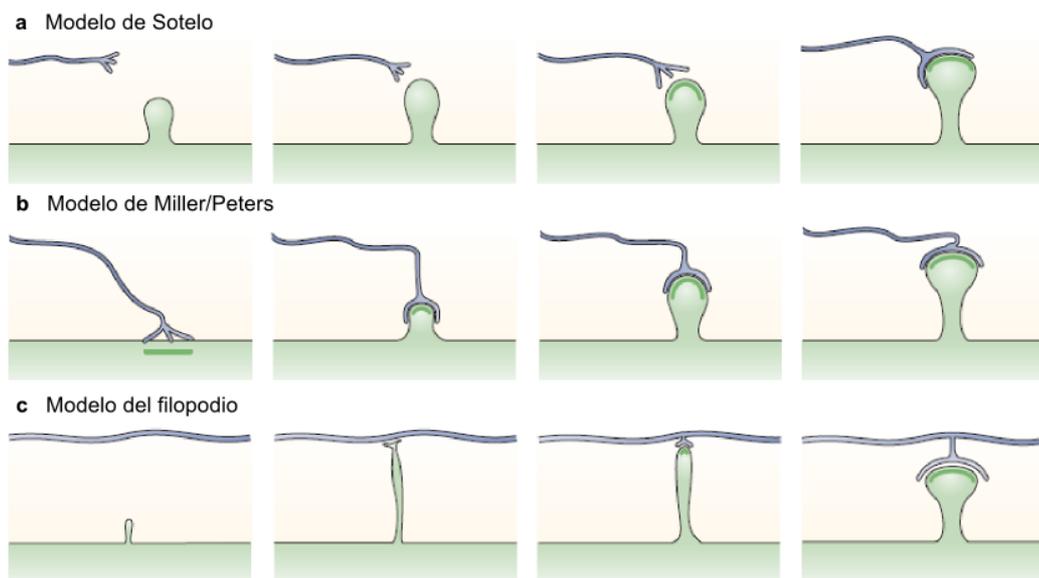


Figura 2. Tres posibles modelos para la espinogénesis. El diagrama ilustra las características esenciales de los tres modelos de espinogénesis. En el modelo de Sotelo (a) las espinas emergen independientemente del terminal axónico. En el modelo de Miller/Peters (b) es el terminal axónico quien induce la formación de la espina. Finalmente en el modelo del filopodio (c) un filopodio dendrítico captura la terminal axonal y se convierte en una espina. Modificado de Yuste y Bonhoeffer, 2004.

1.2 Plasticidad Sináptica Asociada a la Exposición a Drogas de Abuso

Se cree que los cambios conductuales y psicológicos que se suscitan como consecuencia de una experiencia, son mediados por una reorganización o fortalecimiento de las conexiones sinápticas en circuitos neuronales específicos. (Robinson y Kolb 2004). Actualmente, hay un gran interés en este campo de estudio dado a que todavía los mecanismos moleculares involucrados en la reorganización estructural de dichos circuitos, no se encuentran del todo dilucidados (Lamprecht y LeDoux 2004).

La mayoría de los estudios llevados a cabo sobre plasticidad sináptica, involucran procesos como el aprendizaje, el LTP, el estrés, las manipulaciones ambientales, etc., que cambian las sinapsis o la estructura dendrítica. Sin embargo uno de los ejemplos mas sorprendentes de plasticidad dependiente de un estímulo es la adicción, en donde la experiencia con una droga puede provocar cambios conductuales y psicológicos que pueden perdurar toda la vida (Robinson y Kolb 2004). Asimismo, cada vez existe más evidencia que las drogas de abuso usurpan muchos de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en otras formas de plasticidad sináptica (Berke y Hyman 2000; Nestler 2001; Hyman y Malenka 2001). Se piensa que estos mecanismos involucran cambios iniciados, en parte, por la entrada de calcio vía receptores NMDA, la activación de cascadas de señalización intracelulares que alterarían la expresión de genes, moléculas de adhesión, de proteínas relacionadas al citoesqueleto y de otras proteínas necesarias para la formación de las sinapsis (Lamprecht y LeDoux 2004). Asimismo numerosos estudios encontraron un aumento de la liberación del factor neurotrófico BDNF, cuando se estimula con psicoestimulantes; por ejemplo los niveles del ARNm de BDNF aumentan en la corteza prefrontal luego de una sola inyección con cocaína (Le Foll et al. 2005) y en amígdala basolateral, corteza piriforme e hipotálamo paraventricular, luego de la administración repetida con Anf (Meredith et al. 2002); otros trabajos observaron que la administración con una sola inyección de Anf incrementa la inmuno-marcación con un anticuerpo que reconoce al receptor fosforilado de TrkB (el mismo sufre auto-

fosforilación, luego de ser activado por BDNF) en NAc y Cpu, dos horas después de dicha administración (McGinty et al. 2011; Saylor y McGinty 2008).

La plasticidad sináptica y el área donde se expresará dicha plasticidad inducida por los psicoestimulantes, varía según el protocolo de administración (tratamiento crónico ó agudo, auto-administración ó administración por el experimentador, administraciones ininterrumpidas o con un período de abstinencia, ambiente novedoso versus jaula hogar, etc.), tipo de droga y la dosis de la misma.

La administración repetida de psicoestimulantes modifica la morfología dendrítica, la excitabilidad de membranas, la expresión diferencial de genes y la liberación de neurotransmisores en distintas áreas del cerebro (Sorg et al. 1997; Crombag et al. 2005; Norrholm et al. 2003; Robinson y Kolb 2004; Dong et al. 2005). Estudios realizados por Robinson y Kolb (1997), encontraron que el tratamiento crónico con Anf provoca cambios prolongados en el comportamiento, incluyendo una sensibilización a los efectos locomotores y de recompensa. Estos cambios se ven reflejados en adaptaciones estructurales en áreas del cerebro que median los efectos de activación motora y de recompensa, como lo son el Núcleo Acumbens (NAc) y la corteza prefrontal (CPf). Mas aún, observaron un incremento en la longitud dendrítica, un aumento en la densidad de espinas dendríticas y un incremento de espinas bífidas. Asimismo, el aumento en la densidad de espinas ha sido reportado en dendritas distales del NAc, lo cual sugiere que la Anf provocaría cambios estructurales en áreas donde interacciona la dopamina y el glutamato (Li et al. 2003). Otro trabajo llevado a cabo por estos mismos autores (Robinson y Kolb 2004), demuestran que animales entrenados para auto-administrarse Anf de manera crónica, presentan un aumento de espinas dendríticas en neuronas del NAc, mientras que en hipocampo, encuentran un incremento de espinas en ambas condiciones experimentales: ratas que se auto-administran cocaína o sacarosa. Por otra parte, un estudio mas reciente llevado a cabo por Nestler y colaboradores (2012), en el cual administran cocaína de manera crónica a ratones y sacrifican a diferentes horas de abstinencia, observan una plasticidad sináptica diferencial a subregiones del NAc, mostrando un aumento en la densidad de espinas de la corteza del NAc (en dendritas

proximales) pero no en el centro en NAc.

En un interesante estudio, observan que en rebanadas de hipocampo provenientes de animales administrados con cocaína por 5 días, hay un aumento en LTP en la región de CA1 versus rebanadas de hipocampo de animales controles (Thompson et al. 2002). Otro estudio también llevado a cabo por Thompson y colaboradores (Thompson et al. 2005) encuentran que en rebanadas agudas de hipocampo, cocaína tiene un efecto bifásico sobre la magnitud del LTP dependiente de la dosis. A dosis moderadas de cocaína (5-10 μM) provoca un aumento del LTP y a dosis altas (30 μM) inhibe el LTP. A su vez observan que para que aumente el LTP a dosis moderadas es necesaria la señalización de receptores del tipo D2, ya que al inhibirlos se previene dicho efecto. Lo cual sugiere que la dopamina liberada en presencia de cocaína puede actuar vía receptores del tipo D2 para provocar un aumento significativo del LTP en la región CA1 del hipocampo.

Hasta el momento existen pocos antecedentes donde se estudie el efecto de drogas de abuso *in vitro*. Experimentos realizados en cultivos de la línea celular PC12 tratadas por 5 días con Anf, muestran un incremento en el porcentaje de células con neuritas respecto a los cultivos controles. Este efecto lo observan a los 10 días posteriores al retiro de la droga del medio de cultivo, y concluyen que no es necesaria la integración de un circuito sináptico como así tampoco una neuroanatomía intacta para que se desarrolle dicho fenómeno (Park et al. 2002).

1.2.1 Las Drogas de Abuso

La adicción se define como una enfermedad crónica del cerebro con recaídas, caracterizada por la búsqueda y el uso compulsivo de drogas, a pesar de sus consecuencias nocivas. La adicción, es un desorden devastador acompañado de grandes costos sociales y médicos, que hoy en día es aceptada como una enfermedad neurológica que comprende factores genéticos y sociales (London 2005; Nestler 2001; Kreek 2001). Los cambios que provocan pueden durar largo tiempo y llevar a comportamientos peligrosos.

A partir de datos estadísticos se puede estimar que por ejemplo en los EEUU, el

abuso y la adicción al alcohol, la nicotina y a las sustancias ilegales provocan un gasto de más de 500 mil millones de dólares al año, si se suma su impacto médico, económico, penal y social. A su vez, cada año el abuso de drogas ilícitas y del alcohol contribuye a la muerte de más de 100.000 personas en ese país (Rehm et al. 2009).

A pesar de las graves consecuencias que representa esta patología para los individuos y los altos costos que le implican a la sociedad, los precisos mecanismos moleculares y celulares subyacentes al proceso de adicción a drogas quedan aún por ser dilucidados. Por todo lo expuesto es importante determinar dichos mecanismos, para así encontrar potenciales blancos para el tratamiento de este tipo de desordenes.

1.2.2 Anfetamina

La Anf es un psicoestimulante, mas precisamente es una fenilisopropilamina, cuyo isómero más potente a nivel central es el *dextro*. Esta puede ser consumida por vía oral, siendo absorbida por tracto digestivo y sus efectos euforizantes aparecen entre los 30 y 60 minutos, perdurando de 8 a 24 horas. En humanos, la forma mas corriente de administración es por vía intravenosa, por inhalación o fumada (Scott y Aperia 2009) (Fernandez E., 2006), mientras que en animales de experimentación, es administrada de manera intraperitoneal, auto-administración o mediante la colocación de bombas subcutáneas.

La Anf y sus variantes químicas (metanfetamina, metilfenidato, éxtasis, y hierbas como la efedra), tienen un importante rol medicinal y social en muchas culturas. Éstas ejercen importantes efectos sobre la función mental y el comportamiento, pudiendo producir neurodegeneración y adicción (Sulzer et al. 2005).

1.2.3 Modo de Acción

Los psicoestimulantes actúan a nivel de los terminales axónicos de neuronas liberadoras de monoaminas (dopamina, serotonina y norepinefrina) (Berke y Hyman 2000) aumentando la concentración de estos neurotransmisores en el espacio sináptico por diferentes mecanismos. Por ejemplo, la cocaína aumenta la concentración extracelular de

dopamina (DA) por bloqueo de la recaptación en el terminal presináptico, inhibiendo al transportador de DA (DAT). Mientras que el mecanismo de acción de Anf es más complejo, esta actúa como un inhibidor competitivo del DAT, ya que funciona como un sustrato de este, transportando la Anf al interior del terminal sináptico. Una vez dentro del terminal, Anf es transportada al interior de las vesículas sinápticas por medio de difusión y a través del transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT-2), donde aumenta el pH de estas y produce que la DA se libere dentro del terminal sináptico, donde finalmente escapa de la célula mediante un transporte reverso a través del DAT (Sulzer et al. 2005; Leviel 2001; Kalivas 2007; Nestler et al. 1999; Sulzer 2011). Este mecanismo resulta en un dramático incremento de la DA extracelular, el cual se lo relaciona con las propiedades psicoestimulantes de Anf (ver fig. 3).

Asimismo, la Anf posee otros mecanismos por los cuales puede alterar los niveles extracelulares de DA, regulando dos enzimas que intervienen en la síntesis y catabolismo de esta: Anf promueve la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH), que es la enzima limitante en la síntesis de DA (sintetiza el precursor de DA, L-DOPA) e inhibe la actividad de la monoamina oxidasa (MAO) enzima citosólica que degrada la dopamina (fig. 3).

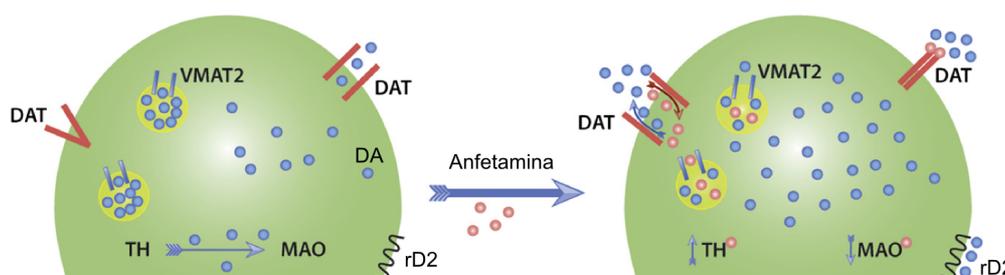


Figura 3. La Anfetamina ejerce múltiples efectos que en conjunto actúan para aumentar los niveles de DA extra-sinápticos por un mecanismo de liberación que es independiente de la fusión de vesículas sinápticas e inhibe la recaptación de DA. La Anf es sustrato del DAT y actúa favoreciendo la liberación de DA citosólica a través del transporte reverso. Además, actúa como inhibidor competitivo del DAT, y por lo tanto hace más lenta la recaptación de DA a través del DAT. Una vez en el citosol, Anf aumenta la DA citosólica, por tres mecanismos: (1) activando la TH; (2) inhibiendo la MAO y (3) redistribuyendo la DA vesicular al citosol. Abreviaturas: DA, Dopamina; VMAT-2, transportador vesicular de monoaminas tipo 2; DAT transportador de dopamina; TH, tirosina hidroxilasa, MAO, monoamina oxidasa. Modificado de Sulzer y colaboradores, 2011.

1.2.4 Dopamina y su Transportador

DA es un neurotransmisor que esta involucrado en una variedad de funciones cognitivas, motivacionales, neuroendócrinas y motoras (Greengard et al. 1999). Los dos grupos mas grandes de neuronas dopaminérgicas en el cerebro de un mamífero se encuentran en la substancia nigra pars compacta (SN) y en el área tegmental ventral (VTA). Las neuronas de la SN forman la vía nigroestriatal que proyecta principalmente al estriado dorsal, controlando los reflejos posturales y la iniciación del movimiento. Desde el VTA parten dos vías: la vía mesocorticolímbica, que proyecta a áreas subcorticales y núcleos límbicos y la vía mesocortical, la cual proyecta principalmente al cingulado y cortezas entorrinal y prefrontal medial.

Una vez liberada la DA en respuesta a la llegada de los potenciales de acción, ésta es retirada rápidamente del espacio sináptico nuevamente hacia el interior de la neurona a través del transportador de alta afinidad DAT, regulando de este modo tanto la duración, como la intensidad de la transmisión sináptica. DAT se expresa selectivamente en la membrana plasmática de axones, dendritas y soma de las neuronas dopaminérgicas, encontrándose altamente enriquecido en la periferia de las sinapsis, pero ausente dentro de las áreas sinápticas activas (Nirenberg et al. 1996; Nirenberg et al. 1997). DAT es parte de una familia de transportadores Na⁺/Cl⁻ de la que también forman parte el transportador de noradrenalina, el transportador de serotonina y un transportador de ácido γ -aminobutírico (GABA) con los cuales comparte homología y mecanismos de regulación (Torres 2006). Dada su importancia, la función de DAT es altamente regulada por una amplia gama de moléculas, que incluyen a la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC), CAMKII, TrK y α -sinucleína, entre otros (Chang et al. 2001; Torres 2006).

El principal mecanismo de regulación de la función de DAT es llevado a cabo a través de la modulación de sus niveles en la membrana plasmática, mediante endocitosis (Melikian y Buckley 1999). Esta endocitosis, es realizada en vesículas cubiertas de clatrina, pudiendo responder tanto a mecanismos constitutivos de reciclaje o ser regulada también por diversas proteínas y señales intra o extracelulares (Melikian 2004; Sorkina et al. 2005). El mecanismo más estudiado y aparentemente más importante en la regulación de la

función del DAT es la endocitosis por medio de la activación de PKC en respuesta a estímulos como despolarización o aumentos en los niveles de Ca^{2+} (Loder y Melikian 2003). Por otro lado, la insulina o el BDNF producen aumentos en los niveles de inserción de DAT en la membrana plasmática a través de receptores TrK, los cuales activan vías de señalización que incluyen a la quinasa de fosfoinositol 3 (PI3K) y MAPKs (proteína quinasas activadas por mitógenos) (Hoover et al. 2007).

Los niveles de inserción del DAT en la membrana plasmática son también regulados por los niveles de DA en la sinapsis. Estudios realizados en líneas neuronales y en sinaptosomas de cuerpo estriado, demostraron que la administración de dosis fisiológicas de DA producen un aumento rápido de los niveles de DAT en la membrana plasmática (Furman et al. 2009). Por otro lado, ha sido demostrado que dosis mayores de DA producen una disminución de los niveles del DAT en la superficie celular (Chi y Reith 2003; Richards y Zahniser 2009). Estos resultados podrían ser explicados si se tiene en cuenta que inmediatamente después de la liberación de DA, sería necesaria una mayor capacidad de recaptación de DA por lo que se favorecería la inserción de DAT en la membrana (Furman et al. 2009). Por otro lado, la disminución de DAT luego de períodos prolongados de altas concentraciones de DA podría representar un mecanismo de protección, dado que la DA citosólica puede ser tóxica para las neuronas (Ziv et al. 1994). Además, ha sido demostrado que moléculas que actúan como sustrato para DAT, especialmente Anf, producen efectos en el tráfico de DAT desde y hacia la membrana en una manera muy similar a lo observado con DA, es decir un aumento transitorio a bajas dosis, y una disminución crónica a mayores dosis y tiempos de administración (Kahlig y Galli 2003; Furman et al. 2009; Richards y Zahniser 2009). Contrariamente, fármacos que bloquean al DAT, como cocaína y metilfenidato, producen aumentos en los niveles de expresión de dicho transportador y un aumento en los niveles de recaptación de DA luego de la eliminación de estos (Little et al. 2002; Kahlig y Galli 2003).

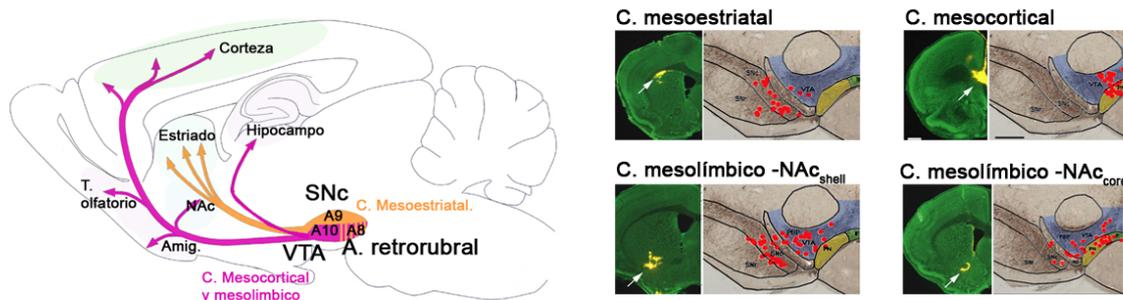


Figura 4: Circuitos dopaminérgicos mesoestriatal, mesocortical y mesolímbico. En la imagen de la izquierda se observan un diagrama de las aferencias de cada circuito. En el panel de la derecha se observan imágenes de la ubicación de los somas dopaminérgicos y las áreas hacia donde éstos proyectan sus axones. Modificado a partir de Bjorklund y Dunnett, 2007b y Lammel y col., 2008.

1.2.5 Receptores de Dopamina

La acción de DA se encuentra mediada por receptores pertenecientes a una familia de siete proteínas G transmembrana (GPCR). Existen cinco genes que codifican para receptores dopaminérgicos: D1, D2, D3, D4 y D5, los mismos son clasificados en dos grupos **D1** y **D2** basado en la homología de secuencias de aminoácidos y según su perfil farmacológico y funcional.

Los receptores **D1** (rD1), que incluyen los receptores D1 y D5, están acoplados a proteínas G α S que estimulan a adenilato ciclasas, incrementando la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que luego provoca la activación de PKA, desencadenando subsecuentemente la activación de diversas cascadas de señalización, incluyendo la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK, del inglés). Los receptores D2, incluyen D2, D3 y D4, se encuentran acoplados negativamente a la vía de señalización, AMPC/PKA. Asimismo, los receptores del tipo D2, modulan los niveles de Ca⁺² y un variado número de procesos intracelulares dependientes de la señalización de Ca⁺². Así la DA, a través de diversos mecanismos dependientes e independientes de Ca⁺² y AMPC, influencia la actividad neuronal, plasticidad sináptica y el comportamiento (Nicola et al. 2000; Seamans y Yang 2004; Surmeier et al. 2007).

Los receptores de dopamina se encuentran distribuidos en el soma y a lo largo del árbol dendrítico de neuronas receptoras de DA. Sin embargo, una población única y

desproporcionadamente grande de receptores de DA se localizan en las espinas dendríticas, donde ocurren la mayoría de las sinapsis glutamatérgicas excitatorias. Además, un subgrupo de espinas que presentan receptores de DA se encuentran inervadas por terminales glutamatérgicas y dopaminérgicas simultáneamente (Levey et al. 1993; Bergson et al. 1995). Los receptores de DA que están en las espinas dendríticas difieren de los receptores extra-sinápticos, en que se encuentran física y tal vez funcionalmente confinados al pequeño volumen de las espinas. Éstos receptores podrían moldear las propiedades biofísicas de las espinas individuales en respuesta a procesos cognitivos y motivacionales. Por otra parte, existen evidencias que demuestran que los receptores de DA que se encuentran en las espinas están asociados al PSD (Zhang et al. 2007).

El rD1 se expresa en varias regiones del cerebro como la corteza, hipocampo, amígdala y más intensamente en el estriado, bulbo olfatorio y sustancia nigra. El 50% de las neuronas espinosas medias (NEM, neuronas estriatales) del estriado expresan rD1. Estos receptores se localizan principalmente en la cabeza de la espina, eje dendrítico y menos frecuentemente en el soma de dichas neuronas. En la corteza y el hipocampo los rD1 se expresan principalmente en neuronas piramidales, predominantemente con localización subcelular en espinas de dendritas apicales, dichos receptores también se encuentran presentes en una subpoblación de interneuronas (Bergson et al. 1995). En neuronas piramidales de la corteza, los receptores D5 (rD5) se encuentran co-expresados con los rD1 y se localizan predominantemente en el eje dendrítico, donde las neuronas gabaérgicas (de tono inhibitorio) forman principalmente contactos post-sinápticos. La distribución de los rD1 y rD5 a nivel subcelular sugiere que podrían estar mediando distintas funciones, excitatoria e inhibitoria respectivamente. La localización subcelular de los rD2 es post y pre-sináptica. Pre-sinápticamente en el estriado y corteza prefrontal, se encuentran asociados con regiones que proyectan aferentes dopaminérgicas y glutamatérgicas. Post-sinápticamente están concentrados en los ejes dendríticos y en espinas de neuronas piramidales de la corteza y en NEM del estriado.

1.2.6 Inervación Dopaminérgica y Localización de Receptores

Las neuronas dopaminérgicas hacen contacto con una gran variedad de células post-sinápticas en múltiples regiones del cerebro como el estriado, la corteza, el hipocampo y la amígdala (fig. 4). La región que se encuentra más densamente inervada es el estriado, donde casi la totalidad de las NEM se encuentran inervadas por DA debido a la extensa ramificación de los axones dopaminérgicos. El 90-95 % de las células estriatales son NEM, y son el principal blanco de las inervaciones provenientes de corteza y tálamo. Éstos estímulos glutamatérgicos regulan la densa población de espinas que presentan las NEM. La mayoría de las varicosidades dopaminérgicas están en contacto con las espinas y en menor medida con el eje dendrítico y con el soma neuronal, formando de esta manera sinapsis axo-somáticas, axo-dendríticas y axo-espinales. Las sinapsis axo-dendríticas generalmente se forman en los ejes dendríticos proximales, mientras que las sinapsis axo-espinosas se dan predominantemente en dendritas distales. Una subpoblación de espinas es inervada simultáneamente por terminales dopaminérgicas y glutamatérgicas, formando el "circuito microestriatal" o la "triada sináptica" (fig. 5). En las neuronas piramidales de la corteza y del hipocampo, se observa una arquitectura de inervación dopaminérgica similar. Este arreglo en "triada" puede funcionar como un detector de coincidencia heterosináptico mediante el cual la activación de terminales dopaminérgicas puede influenciar selectivamente la convergencia glutamatérgica a nivel de la espina dendrítica (Yao et al. 2008).

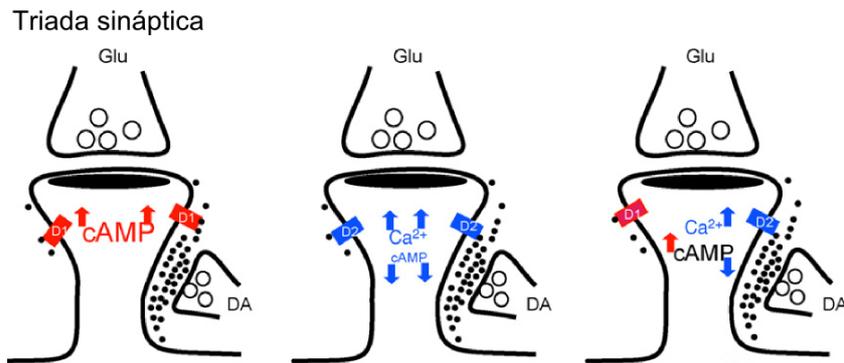


Figura 5. Configuración hipotética de las espinas según el contenido de rDA. Las triadas sinápticas, reciben inervaciones dopaminérgicas en el cuello de la espina y puede servir como detector de señal dopaminérgica tanto tónica como fásica. Las espinas que contienen rD1, rD2 y rD1/rD2 responden de manera diferente a la estimulación por DA, por lo tanto pueden presentar una fisiología sináptica distintiva. La activación de rD1 aumenta los niveles de AMPc, mientras que la activación de rD2 los disminuye. La activación de rD2 puede contribuir a la señalización de Ca^{2+} en la espina. Los tamaños de fuente de letra representan los niveles hipotéticos de cAMP o Ca^{2+} . Modificado de Yao, Spealman, y Zhang 2008.

1.2.7 Señalización Dopaminérgica

Un integrante importante de la señalización dopaminérgica es la fosfoproteína regulada por AMPc y dopamina, PM-32 kD (DARPP-32). La señalización de dopamina a través de los rD1, activa la adenilato ciclasa, resultando en una producción de AMPc y una consecuente fosforilación de DARPP-32 en la treonina 34 mediada por PKA. Esta fosforilación convierte a DARPP-32 en un potente inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (PP1, del inglés)(Nairn et al. 2004; Nishi et al. 2000). PP1 es una serina/treonina fosfatasa que regula muchas fosfo-proteínas en el cerebro de los mamíferos. Por lo tanto, la activación de rD1 puede llevar a un aumento del estado de fosforilación de una serie de fosfo-proteínas, incluyendo receptores de neurotransmisores, canales iónicos, bombas iónicas y factores de transcripción a través de la regulación de la actividad de PP1. La estimulación de rD2 lleva a la inhibición de la señalización de PKA, por lo tanto una disminución de DARPP-32-treonina 34 (ver fig. 6).

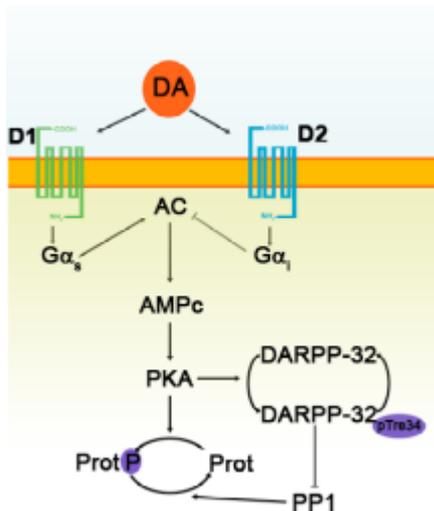


Figura 6. Vías de señalización de los receptores D1 y D2. AC: adenilato ciclasa. AMPc: adenosina monofosfato cíclica. PKA, proteína quinasa A. DARPP-32: Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc, de peso molecular 32kDa. PP1: proteína fosfatasa 1. Modificado de (Tritsch y Sabatini 2012).

1.2.8 Circuitos Neuronales Importantes que Intervienen en la Adicción a Drogas

- **Anatomía Básica del Circuito de Recompensa**

Los sustratos neurobiológicos naturales que modulan la recompensa del aprendizaje y del comportamiento motivado, son algunas de las funciones evolutivamente más conservadas en el cerebro de los mamíferos y funcionan para dirigir todos los recursos a procurar comida y reproducción (Walker y *col.*, 1996). Las drogas de abuso usurpan estas funciones básicas, esencialmente secuestrando muchos de los mecanismos celulares y moleculares fisiológicos de la plasticidad sináptica (Kauer y Malenka 2007; Kalivas 2009; Russo et al. 2010; Sulzer 2011). El NAc, también llamado estriado ventral, juega un rol fundamental en el circuito neuronal responsable de las conductas motivadas, en otras palabras, del tipo de comportamiento que subyace a la búsqueda compulsiva de droga en los adictos a psicoestimulantes. Este tipo de conducta se origina a partir de proyecciones glutamatérgicas en áreas límbicas y corticales (las más importantes son: la amígdala basolateral, el hipocampo y la corteza prefrontal) y convergen en el mismo blanco post-sináptico: NEM del NAc. Luego de la integración de estas inervaciones, el NAc proyecta hacia el Palidum ventral y en el mesencefalo ventral, quienes son los responsables de la ejecución motora del comportamiento motivado. Por lo tanto, el NAc

sirve de interface entre regiones límbicas y sistemas motores y el comportamiento de búsqueda de la droga depende, en última instancia de la transmisión glutamatérgica en el NAc (Wolf 2002; Golden y Russo 2012).

La DA ha sido el foco de estudio en la investigación de adicción a cocaína y Anf, ya que estos psicoestimulantes actúan inicialmente aumentando la liberación de DA y también porque las neuronas dopaminérgicas participan en la ejecución de comportamientos normales relacionados a la motivación y la recompensa. De hecho, la DA se encuentra frecuentemente presente en modelos de adicción basados en el glutamato, dado a que el glutamato y la DA convergen en muchas áreas del cerebro, incluyendo el NAc. Por lo tanto, las mismas NEM que reciben aferencias glutamatérgicas límbicas y corticales también reciben proyecciones dopaminérgicas del VTA (Floresco et al. 2001). La DA regula la interacción entre las proyecciones glutamatérgicas que llegan al NAc, influenciando la transmisión sináptica (Rosenkranz y Grace 2001). Las neuronas dopaminérgicas del VTA también proyectan a regiones límbicas y corticales importantes para la adicción, como lo son la CPF, el hipocampo y la amígdala. La transmisión dopaminérgica en estas regiones modula la actividad de circuitos relacionados a la adicción y es necesaria para algunos tipos de conductas de búsqueda de la droga.

- **Hipocampo**

El hipocampo es un área de particular interés, ya que tiene un rol central en muchos aspectos del proceso adictivo, incluyendo la recaída al uso de drogas (Eisch y Harburg 2006).

El nombre hipocampo proviene por la similitud de dicha región cerebral con el pez de mar (caballito de mar o hipocampo). Se encuentra localizado en el lóbulo temporal del cerebro y en estrecha comunicación con diversas regiones de la corteza cerebral en lo que se denomina sistema o formación hipocampal. El mismo está constituido por el hipocampo (propriadamente dicho), el giro dentado, subiculum y corteza entorrinal (Andersen et al. 2006).

En el hipocampo propriadamente dicho, una capa de células piramidales (denominada

capa principal) describe una trayectoria en forma de “C” invertida en la que se distinguen tres regiones denominadas “Cuerno de Amón” (CA) CA1, CA2 y CA3. A su vez, en el hipocampo se pueden distinguir tres capas corticales: la capa stratum oriens, la capa stratum radiatum y stratum lacunosum-moleculare. La capa celular principal consiste primariamente de células piramidales. Las células piramidales de CA3 son mas grandes y la capa es mas gruesa que la de CA1. Cada célula piramidal tiene un árbol dendrítico apical que se extiende a través del stratum radiatum y del stratum lacunosum-moleculare y también presentan un árbol dendrítico basal que se extiende en el stratum oriens. En el giro dentado se encuentran: una capa principal de células granulares, una capa molecular celular, ubicada sobre la anterior y una capa de células polimórficas o hilus, ubicada debajo de la capa principal (fig. 7)(Tresguerres 2005; Burwell y Agster 2008).

El criterio primordial para incluir a las estructuras corticales dentro de la formación hipocampal, es poseer una estructura trilaminar. A su vez, estas estructuras se encuentran conectadas por un gran circuito unilateral que comienza en las células granulares del giro dentado y envían proyecciones a CA3. En respuesta, las células piramidales de CA3 envían proyecciones unilaterales a CA1. Las neuronas de esta capa proyectan al subiculum y corteza entorrinal. La corteza entorrinal, es la estructura que provee las principales proyecciones hacia el hipocampo (proyecta a toda la formación hipocampal: giro dentado, CA3, CA1 y subiculum). Dicha corteza, proyecta al giro dentado a través del vía perforante y así provee la entrada de aferentes críticas de cortezas asociativas hacia el hipocampo. El pasaje de las fibras perforantes desde la corteza entorrinal forma conexiones excitatorias con las células granulares del giro dentado. Las células granulares llevan los axones que forman el vía de las fibras musgosas (“mossy fibers”, del inglés), el cual conecta con las células piramidales de CA3. Las células piramidales de la región de CA3 proyectan a las células piramidales de CA1 por el pasaje de las colaterales de Schaffer. Las colaterales de Schaffer forman sinapsis a distintos niveles de las dendritas de células de CA1 cerca del cuerpo celular y niveles más distantes. Las conexiones formadas por las colaterales de Schaffer se llaman “sinapsis en passant” debido a que los axones de CA3 continúan pasando a través del stratum radiatum, haciendo contacto con dendritas de muchas otras

células piramidales.

Además, el hipocampo recibe otras aferencias mas débiles como las provenientes de los núcleos del rafe, del locus coeruleus, amígdala, tálamo (Neves et al. 2008).

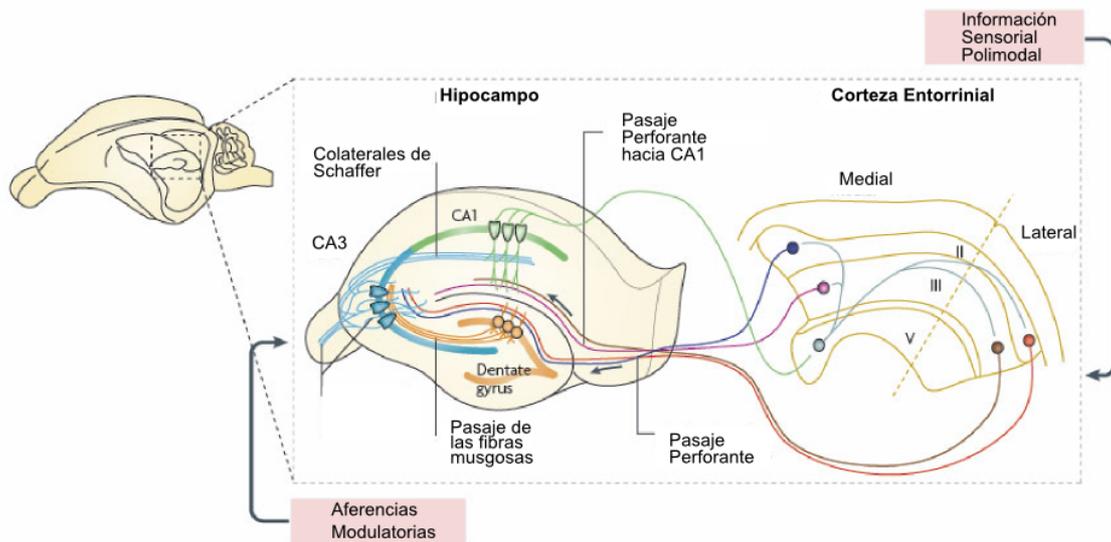


Figura 7. Anatomía básica del hipocampo. Tradicionalmente, el diagrama de inervación del hipocampo es presentado como un circuito trisináptico. La inervación principal es llevada a cabo por axones del vía perforante, que transportan información sensorial polimodal de neuronas de la capa II de la corteza entorrinal hacia el giro dentado. Los axones del vía perforante forman contactos sinápticos excitatorios con dendritas de células granulares. Estas últimas, proyectan a través de sus axones (fibras musgosas), a dendritas apicales de neuronas piramidales de CA3 quienes luego proyectan ipsilateralmente a células piramidales de CA1 a través de las colaterales de Schaffer y contralateralmente a células piramidales de CA3 y CA1, a través de conexiones comisurales. Además del circuito secuencial trisináptico, también hay una densa red asociativa interconectando células de CA3 del mismo lado. Las células piramidales de CA3 también son inervadas por aferencias de células de la corteza entorrinal de la capa II. Las dendritas apicales distales de las neuronas piramidales CA1 reciben aferencias de neuronas de la capa III de la corteza entorrinal. Modificado de (Neves et al. 2008).

1.3 Quinasa Dependiente de Ciclina 5

Las quinasas dependientes de ciclina (Cdks, del inglés), llamadas así por requerir proteínas ciclinas para su activación, fueron inicialmente identificadas y caracterizadas por participar en la progresión del ciclo celular. La quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5, del inglés), es un miembro de la familia Cdk, que fosforilan residuos serina y treonina. Sin embargo, esta quinasa difiere del resto de las Cdks por dos motivos: no requiere de

ciclinas para su activación y no desempeña ninguna función, al menos conocida hasta el momento, en el ciclo celular (Cheung y Ip 2007). La actividad de Cdk5 es regulada fundamentalmente por la asociación con dos proteínas activadoras p35 y p39, aunque también puede ser activada por la Ciclina I (CCNI, del inglés) (Brinkkoetter et al. 2009). A pesar de que Cdk5 se expresa en todos los tejidos, su actividad y expresión es mas alta en el sistema nervioso (Dhavan y Tsai 2001). Durante el desarrollo, los niveles de Cdk5 y p35 se encuentran regulados espacial y temporalmente. En el cerebro adulto los niveles de expresión más elevados se encuentran en el hipocampo de (Delalle et al. 1997). La expresión de p35 y p39 es predominantemente en neuronas post-mitóticas del sistema nervioso. A su vez, el patrón de expresión temporal y espacial de las mismas parece ser complementario (Humbert et al. 2000)(Niethammer et al. 2000). Curiosamente, p39 puede compensar algunas de las funciones de p35, mientras que p35 es capaz de suplir la falta de actividad de p39, como fue demostrado en el ratón transgénico carente de p39, el cual no presenta disfunciones aparentes, siendo p35 capaz de enmascarar su ausencia (Ko et al. 2001).

1.3.1 Regulación de Cdk5.

Como ya se mencionó anteriormente, la actividad de Cdk5 depende de la asociación con uno de sus dos activadores p35 o p39. Estas proteínas pueden sufrir un clivaje por la proteasa calpaina. Por lo tanto, una señal que llegue a la célula e induzca un aumento intracelular de calcio puede provocar la transformación de p35 ó p39 a p25 ó p29, respectivamente (Barnett y Bibb 2011).

La subunidad activadora p35 es una proteína inestable con una vida media de 20-30 minutos. Ésta, es ubiquitinilada y de este modo degradada a través de la vía de proteosoma-ubiquitina. Cdk5 es capaz de fosforilar y regular de manera negativa a p35, ya que las mutantes de p35 que carecen del sitio de fosforilación por Cdk5 presentan una vida media mas larga . Por otra parte, p25 carece de la señal de ubiquitinilación necesaria para ser degradada por proteosomas y es por lo tanto más estable que p35 (Patrick et al. 1998; Shah y Lahiri 2014).

Las Cdks pueden estar hiperactivadas si además de estar unidas a su activador (ciclinas), también son fosforiladas en su bucle de activación en la treonina 160/161 (del inglés, T-loop). Sin embargo, este no es el caso de Cdk5, ya que la interacción de la quinasa con el fragmento proteolítico p25 es suficiente para la máxima activación de Cdk5 (Poon et al. 1997). A su vez, la fosforilación en la treonina 14 y tirosina 15 de las Cdks lleva a la inhibición de estas quinasas (Gu et al. 1992). Lo mismo se respeta en Cdk5 para la treonina 14 (Matsuura y Wang 1996), mientras que la fosforilación en la tirosina 15 de Cdk5 es estimuladora. Esta fosforilación es llevada a cabo por varias tirosina-quinatas como por ejemplo: c-Abl y puede ser facilitada por la asociación de Cdk5 con la proteína cable, la cual es una proteína de unión a Abl (Zukerberg et al. 2000). Sin embargo, recientemente ha sido publicado que dicha fosforilación en la tirosina 15 de Cdk5 ocurre solo cuando la quinasa se encuentra en su forma monomérica, ya que la co-expresión, en cultivos de neuronas, de cualquiera de sus activadores p35/p25, p39 o CCNI, inhibe dicha fosforilación. Este estudio sugiere que la fosforilación en la tirosina 15 no sería un mecanismo de activación de la quinasa Cdk5 (Kobayashi et al. 2014). Por otra parte, Cdk5 puede ser inhibida por la ciclina D1 (Modi et al. 2012), ciclina E y por la glutatión S transferasa P (GSTP1) (Sun et al. 2011).

De manera interesante, Cdk5 y p35 también pueden ser reguladas a nivel transcripcional. Estudios llevados a cabo en cultivos neuronales en presencia de la glicoproteína de la matriz extracelular, laminina, revelaron que aumenta la actividad de Cdk5, por lo que la asociación de lamina con receptores de integrinas podría inducir la expresión de p35 (Pigino et al. 1997; Paglini et al. 1998; Li et al. 2000). Por otra parte, el factor de crecimiento neuronal (NGF, del inglés) induce la expresión de p35 a través de la vía de señalización de ERK (Harada et al. 2001). Además, BDNF induce la actividad quinasa de Cdk5 en cultivos primarios de neuronas (Tokuoka et al. 2000) (fig. 8).

En relación a la temática desarrollada en esta tesis, los psicoestimulantes, como cocaína y Anf, también incrementan la expresión de p35 y Cdk5 (Bibb et al. 2001). Un aumento del factor de transcripción Δ FosB es observado luego del tratamiento crónico con cocaína y los niveles de ARNm y la expresión de Cdk5 están aumentados en el cuerpo

estriado e hipocampo de ratones transgénicos que expresan Δ FosB. Asimismo, la sobre-expresión de este factor de transcripción en células induce la expresión del promotor de Cdk5, lo que podría indicar que Cdk5 podría ser un blanco de Δ FosB por el cual mediaría alguno de los efectos fisiológicos a largo plazo en el cerebro (Bibb et al. 2001).

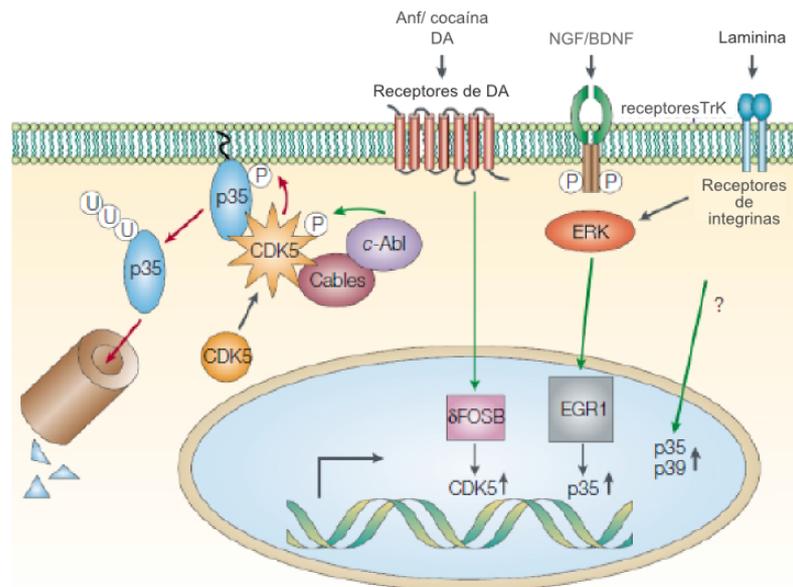


Figura 8. Regulación de Cdk5. Cdk 5 es reclutada a la membrana a través de su interacción con p35, quien se encuentra miristoilada, p35 presenta una vida media corta, como consecuencia de ser fosforilada por Cdk5, lo cual la convierte en blanco para ser degradada por proteosomas mediado por ubiquitina. Modificaciones transcripcionales como ser fosforilada por c-Abl, puede regular la actividad de Cdk5. La unión de laminina a receptores de integrinas puede estimular la transcripción de p35 y p39. El tratamiento a neuronas con el factor neurotrófico derivado de cerebro (NGF) o con BDNF induce la señalización a través de ERK, quien media la expresión de p35. El factor de transcripción δ FOSB promueve la expresión de Cdk5 en respuesta al tratamiento con psicoestimulantes. Las flechas verdes y rojas representan mecanismos reguladores estimulantes o inhibitorios, respectivamente. Modificado de Dhavan y Tsai, 2001.

1.3.2 Localización Subcelular de Cdk5

Cuando Cdk5 es sobre-expresada no muestra un patrón de distribución específico, pero al ser co-expresada con p35 se ve enriquecida en la periferia celular. Por lo tanto la localización subcelular de Cdk5, esta determinada por p35 (Niethammer et al. 2000; Fu et al. 2001). Tanto p35 como su isoforma altamente homóloga p39 se encuentran enriquecidas en fracciones de membrana y experimentos de inmunocitoquímica revelan

una señal intensa de p35 en la periferia de la célula (Ko et al. 2001). Esto se debe principalmente a que los activadores p39 y p35 presentan un motivo aminoterminal con una señal para ser miristoiladas, lo que les confiere una localización en membrana. Cuando p35 es clivada, el fragmento remanente p25, pierde una pequeña porción N-terminal y de este modo su señal de localización en membrana provocando que el complejo Cdk5/p25 se trasloque a citosol pudiendo cambiar así sus blancos (Greengard et al. 1999). Este cambio en la localización de Cdk5 ha sido fuertemente asociado con la hiperfosforilación de componentes del citoesqueleto como Tau, MAPs y neurofilamentos, llevando a la célula a la muerte (Pei et al. 1998). Por lo que, el complejo Cdk5/p25 ha sido relacionada con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ALS) . Sin embargo, hay nuevas y crecientes evidencias que relacionan a p25 con procesos de plasticidad sináptica, cuando esta se expresa de manera transitoria (Fischer et al. 2005; Mlewski et al. 2008). Ha sido demostrado que la entrada de Ca^{+2} inducida por la activación de receptores NMDA, provoca la generación de p25, y dicha formación es dependiente de la proporción de Ca^{+2} . Así, un alto influjo de calcio produce una prolongada activación de Cdk5 por la formación de p25 (Kerokoski et al. 2004).

Por otra parte, el complejo Cdk5/p35 también está presente en membranas del aparato de Golgi donde se asocia con una fracción insoluble a detergente enriquecida en actina. La inhibición de la actividad de Cdk5 disminuye la formación de vesículas de membrana desde el aparato de Golgi, sugiriendo un rol de este complejo en el tráfico de membranas (Paglini et al. 2001).

1.3.3 Funciones de Cdk5

Desde que fue identificada, hace ya mas de veinte años, Cdk5 ha emergido como un regulador fundamental en la migración neuronal durante el desarrollo del SNC. Además Cdk5 fosforila numerosos sustratos, involucrados en la regulación de una variedad de procesos, desde adhesión y motilidad hasta plasticidad sináptica y adicción a drogas (fig. 9). Como así también, ha sido involucrada en enfermedades neurodegenerativas. A continuación detallaremos solo aquellas funciones que sean

pertinentes para este trabajo

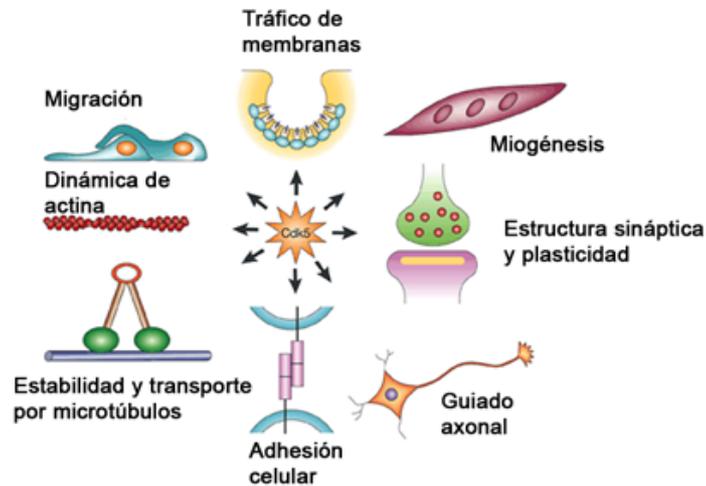


Figura 9. Funciones celulares de Cdk5. Modificado de Dhavan y Tsai, 2001.

- **Regulación de la dinámica del citoesqueleto.**

Como vimos anteriormente, la familia de las pequeñas Rho GTPasas son importantes en la regulación de la dinámica de actina y algunos miembros de esta familia están directamente involucrados en la guía axonal, crecimiento de las neuritas y motilidad celular (Luo 2000). En cultivos de neuronas, p35 y Cdk5 se encuentran mayormente en la periferia de los conos de crecimiento, colocalizando con F-actina, con Rac y su efector Pak1 (Nikolic et al. 1998). Cdk5 fosforila de manera Rac dependiente a Pak1 en la treonina 212 (Rashid et al. 2001) provocando que se hiperfosforile y como consecuencia disminuya la actividad de Pak, esto promueve en última instancia, la dinámica del citoesqueleto de actina (Rashid et al. 2001). Estudios recientes proponen que Cdk5 interacciona directamente con G-actina inhibiendo su actividad, de manera independiente de la interacción con cualquiera de sus activadores. Cabe destacar que esta asociación de la quinasa con la actina, no impide la formación del complejo Cdk5/p35 o Cdk5/p25 (Xu et al. 2011). A su vez, otros estudios demostraron que solo p35 y no p25 es capaz de

interactuar con con F-actina a través de su región N-terminal provocando la formación de haces de actina y estabilizando el filamento (He et al. 2011).

Cdk5 también se asocia con el citoesqueleto de microtúbulos, por ejemplo con algunas proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, por sus siglas del inglés) incluyendo MAP1B y Tau (Pigino et al. 1997; Paglini et al. 1998). Se ha observado que la fosforilación de MAP1B por Cdk5 en macroneuronas cerebelares, interviene en la extensión neurítica. Asimismo, la fosforilación de Tau por Cdk5, reduce la unión de esta proteína a los microtúbulos, en consecuencia inhibe la habilidad de Tau de promover el ensamblaje microtubular y disminuye la actividad de nucleación (Evans et al. 2000).

- **Funciones Sinápticas de Cdk5 y Plasticidad Sináptica.**

Ha sido descrito que tanto Cdk5 como p35 se encuentran enriquecidos en las sinapsis, a su vez se sabe que Cdk5 regula una gran cantidad de proteínas sinápticas, lo cual implicaría que esta quinasa desempeña un importante rol en la transmisión sináptica (Tomizawa et al. 2002). De manera interesante, la inducción de plasticidad sináptica como también el aprendizaje espacial dependiente de hipocampo, se encuentra alterado en ratones transgénicos inducibles deficientes para Cdk5 y p35 (Lai y Ip 2009; Guan et al. 2011). A su vez, experimentos llevados a cabo en ratones transgénicos inducibles para p25, revelaron que el aumento de la expresión de manera transitoria de p25 en el hipocampo aumenta el LTP y facilita la memoria dependiente de hipocampo (Fischer et al. 2005). De acuerdo con este estudio, Angelo y colaboradores. demostraron que una baja expresión de p25 en hipocampo de ratones transgénicos, mejora el aprendizaje espacial (Angelo et al. 2003). Llamativamente, las mutaciones con ganancia de función de Cdk5 resultaron en un incremento del número de sinapsis *in vivo* y la facilitación del LTP en rebanadas agudas (Fischer et al. 2003), mientras que la pérdida de la actividad de Cdk5 en los ratones deficientes para p35, resultó en una reducción del LTD en el hipocampo (Ohshima et al. 2005). En contraste, un modelo de ratón inducible deficiente en Cdk5, exhibió una reducción de la degradación de las subunidades NR2B de receptores NMDA, resultando en una facilitación del LTP y un aumento de la formación de memoria (Hawasli

et al. 2007) .

Cdk5 también esta involucrada en la plasticidad estructural inducida por la neurotrofina BDNF. La estimulación de cultivos primarios hipocampales con BDNF promueve el crecimiento dendrítico y este efecto es dependiente de Cdk5. La quinasa, en presencia de la neurotrofina, es capaz de fosforilar al receptor de BDNF TrkB en la serina 478 y de esta manera recluta a Cdc42 promoviendo, el crecimiento dendrítico (Cheung et al. 2007). Trabajos posteriores del laboratorio de la Dra. Ip (2012), demostraron que la fosforilación por Cdk5 en TrkB-Ser478 es necesaria para la formación del LTP y de la memoria espacial, como así también para la generación de espinas dendríticas bajo dichas circunstancias (Lai et al. 2012).

- **Función Pre-sináptica**

La actividad del terminal pre-sináptico es crucial para la comunicación entre neuronas. Al ser el encargado de llevar las vesículas que contienen los neurotransmisores y ser el lugar de reciclado de vesículas, el botón sináptico es el integrador de la respuesta final de la neurona. Por lo tanto, cualquier regulador de la fusión de vesículas en el terminal axónico es un potencial mediador de la fuerza sináptica para un determinado estímulo (Barnett y Bibb 2011).

En la exocitosis, la fosforilación de Munc-18 (en la treonina-574) por Cdk5 lleva a una disociación de Munc-18 con syntaxina 1A, permitiendo de este modo, que syntaxina 1A participe en la formación del complejo SNARE, requerido para el evento de fusión de membrana y secreción (Fletcher 1999). La inhibición farmacológica de Cdk5 disminuye la secreción total y la sobre-expresión incrementa la exocitosis (Lilja et al. 2004). Cdk5, también fosforila y regula la actividad y conductancia de los canales de Ca^{+2} dependiente de voltaje (VDCCs) tipo P/Q y tipo L (Tomizawa et al. 2002).

Anfifisina 1 y dinamina 1 son fosfo-proteínas que al interactuar participan en la endocitosis de vesículas sinápticas. Ambas proteínas son fosforiladas por Cdk5, sin embargo la fosforilación de dinamina 1 en varios sitios previene su unión con Anfifisina 1. A su vez, la co-fosforilación de anfifisina1 y dinamina1 por Cdk5 impide completamente la

formación de vesículas y por ende la endocitosis (Tomizawa y *col.*, 2003).

Cdk5 también ha sido relacionada con la síntesis del neurotransmisor de DA. Cdk5 fosforila la enzima TH en la treonina-31, provocando su activación y estabilización (Kansy et al. 2004).

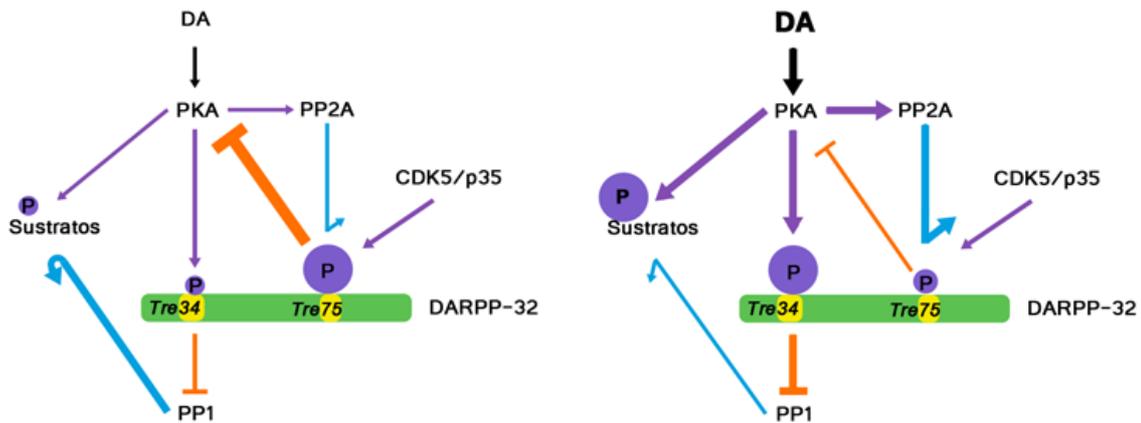


Figura 10. Regulación de la eficiencia de la neurotransmisión dopaminérgica por medio de la proteína DARPP-32. El gráfico señala como dopamina regula a DARPP32 y a la vez como DARPP32 puede regular a DA. Se observa que tanto PKA como Cdk5 convergen en DARPP32, donde se observa la existencia de un equilibrio dinámico y antagónico entre Cdk5 y PKA. DA: dopamina. PKA: proteína quinasa A. PP1: proteína fosfatasa 1. PP2B: proteína fosfatasa 2. P: fosfatos. Tre34: treonina 34. Tre75: treonina 75. Modificado de Nishi y *col.*, 2000.

- **Función Post-Sináptica**

Cdk5 regula numerosas moléculas que participan en diferentes vías de señalización implicadas en plasticidad sináptica y en aprendizaje.

Los receptores de neurotransmisores se encuentran anclados en una matriz intracelular, la PSD. Un componente prominente de esta estructura es la proteína PSD-95 que vincula estructuralmente complejos de señalización con los receptores. Ha sido demostrado que Cdk5 fosforila esta proteína e inhibe la multimerización y el agrupamiento de canales iónicos, regulando de esta manera la densidad de receptores en la membrana (Morabito et al. 2004). Otra proteína residente de la PSD es CaMKII. Cdk5 y sus co-factores interactúan con la subunidad α de CaMKII, de una manera dependiente de calcio, regulando la actividad de esta quinasa (Hosokawa et al. 2006). La modulación de la

función de receptores glutamatérgicos es un mecanismo de regulación de la plasticidad sináptica. Se ha demostrado que Cdk5 fosforila directamente la subunidad NR2A (en la serina-1232) de los rNMDA, resultando en una sobre-regulación de la actividad y conductancia de éstos, favoreciendo la ocurrencia del LTP. Este efecto fue confirmado usando el inhibidor específico de Cdk5, Roscovitina, donde se observa una reducción de la corriente evocada por NMDA (Li et al. 2001).

Cdk5 también regula la endocitosis a nivel post-sináptico, regulando a los receptores NMDA a través de la fosforilación de PSD-95. La inhibición de Cdk5 incrementa la unión de PSD-95 a la tirosina kinasa Src, quien induce la fosforilación de la subunidad NR2B en la tirosina-1472, atenuando de este modo la endocitosis de esta subunidad y aumentando la expresión de la misma en la superficie (Zhang et al. 2008). Cdk5 también puede regular el anclaje de la subunidad GluR2 de los receptores AMPA a través de la fosforilación de proteínas de adhesión como la δ -catenina (Poore et al. 2010).

Por otro lado, Cdk5 cumple un importante rol en la señalización dopaminérgica la cual converge en DARPP-32 (Bibb et al. 1999), una proteína clave que puede funcionar como inhibidor de quinasas o fosfatasa dependiendo de su propio estado de fosforilación, lo que le permite actuar como un “switch” o interruptor molecular (Greengard 2001). Como ya se mencionó anteriormente, la proteína DARPP-32 puede ser fosforilada en la treonina 34 (DARPP-32pTre34) por PKA en respuesta a la señalización a través de rD1 (Greengard 2001). Esta fosforilación convierte a DARPP-32pTre34 en un potente inhibidor de la fosfatasa PP1, responsable de desfosforilar a sustratos de PKA (Hemmings et al. 1984). Esta inhibición resulta en la estabilización de los residuos fosforilados por PKA, aumentando la eficiencia de la señalización a través de rD1/AMPC/PKA. Por otro lado Cdk5, fosforila a DARPP-32 en la treonina 75 (DARPP-32pTre75), lo que previene la fosforilación de esta última por PKA. Además, esta fosforilación convierte a DARPP-32pTre75 en un potente inhibidor de PKA (Bibb et al. 1999). Esto produce una atenuación de la señalización de la vía a través de D1, tanto al inhibir PKA como al liberar a PP1 de su inhibición, permitiendo a este último desfosforilar a los sustratos de PKA y evitando la propagación de la señal iniciada por rD1 (Nishi et al.

2000). Finalmente PKA activa a la fosfatasa PP2A, la cual desfosforila a DARPP-32pTre75. Estos datos demuestran que Cdk5 es un importante regulador de la señalización dopaminérgica, modulando la señalización a través de PKA y que además existe un equilibrio dinámico y antagónico entre Cdk5 y PKA el cual es integrado mediante la proteína DARPP-32 (Nishi et al. 2000) (fig. 10).

1.3.4 Cdk5 y Drogas de Abuso

En los últimos años ha quedado claro que la plasticidad neuronal es un componente importante del proceso biológico que lleva a la adicción a drogas. Mas aún, ha sido posible identificar algunas moléculas que participan en este proceso, siendo Cdk5 una de ellas (Benavides y Bibb 2004).

Nestler y colaboradores, fueron los primeros en encontrar que la administración crónica de cocaína provoca un aumento persistente de la expresión del factor de transcripción de la familia Fos, Δ FosB, en áreas cerebrales asociadas a la recompensa (Hope y *col.*, 1994; Kelz y Nestler, 2000). Mas tarde, Ehrlich y colaboradores (Ehrlich et al. 2002) demostraron que la administración crónica tanto de Anf como de cocaína, en ratones periadolescentes, induce un incremento de dicho factor, en NAc y caudado putamen. Posteriormente, se identificó a Cdk5 como blanco del factor de transcripción Δ FosB mediante el uso de un modelo de raton transgénico inducible que sobre-expresa Δ FosB. Así mismo, se comprobó que los niveles de expresión de proteína y de ARNm de Cdk5 y p35 estaban elevados en respuesta a un aumento de la expresión de Δ FosB y a la exposición crónica con cocaína. Además los niveles del estado de fosforilación de DARPP-32pTre75 se encontraban elevados en cada caso. En línea con estos resultados, la administración crónica de cocaína, mostró una baja actividad basal de PKA (Bibb et al. 2001). A su vez, infusiones diarias del inhibidor farmacológico de Cdk5, Roscovitine, colocadas intra-NAc antes de la inyección de cocaína, potencia los efectos locomotores de la droga (Bibb y *col.*, 2001). Esta respuesta comportamental indicaría que el incremento en la actividad de Cdk5 tendría una función homeostática, disminuyendo la respuesta locomotora a las subsecuentes exposiciones con la droga. En otras palabras, regulando la

neurotransmisión dopaminérgica.

Otros estudios han demostrado un aumento de p35 y de la actividad de Cdk5 en relación con la expresión de la sensibilización comportamental a drogas como Anf (Mlewski et al. 2008) y metanfetamina (Chen et al. 2005), en este último trabajo, también se observó un aumento de DARPP-32pTre75, sugiriendo que el complejo Cdk5/p35 estaría participando en eventos celulares y comportamentales del proceso de sensibilización.

Como ya se mencionó anteriormente, la exposición a psicoestimulantes provoca un aumento en la densidad de espinas dendríticas (Robinson y Kolb 1997; Robinson y Kolb 1999; Li et al. 2003; Lee et al. 2006; Crombag et al. 2005). Por otra parte, infusiones intra-estriatales con el inhibidor de Cdk5, Roscovitine, durante la administración crónica con cocaína previno la proliferación de espinas dendríticas en respuesta a la droga (Norrholm et al. 2003). Esto sugiere que Cdk5 estaría participando en la regulación de los cambios morfológicos asociados con la exposición a cocaína, sin embargo, los mecanismos involucrados en este proceso aún no han sido dilucidados.

Un sustrato de Cdk5 es el factor potenciador de miocitos 2 (MEF2), quien regula la plasticidad de las espinas y tiene como blancos a genes que codifican para proteínas como N-WASP, WAVE3 y profilina 1, todas involucradas en la regulación del citoesqueleto de actina y en la densidad de espinas (Wegner et al. 2008; Pilpel y Segal 2005). MEF2, al ser fosforilado por Cdk5 es inhibido, lo cual conlleva un aumento en la densidad de espinas dendríticas. Por otra parte, la exposición repetida a cocaína suprime la actividad estriatal de MEF2, en parte por la inhibición dependiente de AMPc de la calcineurina. Esta reducción en la actividad es necesaria para el incremento en la densidad de espinas en NAc. La expresión de una mutante hiperactiva de MEF2 inhibe el incremento de las espinas dendríticas, y aumenta las respuestas comportamentales a cocaína (Pulipparacharuvil et al. 2008). Por lo que MEF2, es un potencial regulador de la plasticidad de las espinas en NAc, siendo modulada e inhibida su expresión por Cdk5.

1.4 Construcción de la Hipótesis

Los experimentos realizados durante la última década han permitido lograr un considerable avance en el estudio de los eventos y mecanismos implicados en el proceso de adicción a drogas de abuso. Huelgan evidencias de que varias drogas psicoactivas, alteran la neurotransmisión en circuitos neuronales específicos que normalmente subyacen a los mecanismos de aprendizaje y memoria, así como otras formas de plasticidad sináptica. Como ya detallamos anteriormente, los mecanismos celulares y moleculares del proceso de adicción a drogas pueden ser considerados como respuestas neuroadaptativas las cuales involucran procesos de plasticidad sináptica funcional y estructural. En este sentido, la administración de psicoestimulantes induce cambios en el comportamiento, en el LTP y en la morfología neuronal en áreas mesocorticolímbicas, modificando también la morfología dendrítica, la excitabilidad de membranas, la expresión diferencial de genes y la liberación de neurotransmisores en distintas áreas del cerebro. Más específicamente, ha sido demostrado que la exposición a cocaína o Anf aumenta el número de ramificaciones dendríticas y de espinas en regiones que son ricamente inervadas por dopamina como lo son las neuronas de NAc; sin embargo, existen escasos trabajos en los que se estudie dicha plasticidad estructural en regiones cerebrales que también son importantes para el proceso de adicción a drogas, como lo es el hipocampo. Las dendritas y espinas dendríticas constituyen el sitio donde reside la plasticidad estructural dependiente de experiencias o estímulos. En relación a esto, un gran esfuerzo está dirigido en tratar de comprender cómo diferentes experiencias tales como aprendizaje, estrés, cambios hormonales, cambios ambientales, etc., pueden alterar la organización neuronal para producir cambios para toda la vida en el comportamiento y funciones psicológicas.

Las espinas dendríticas son estructuras muy dinámicas y ricas en actina, y requieren para tal efecto una regulación coordinada de la dinámica del citoesqueleto de actina, llevada a cabo principalmente por las Rho GTPasas y sus efectores, dentro de estos últimos se encuentra Pak, proteína involucrada en la generación de espinas y cuya

actividad es modulada por Cdk5. Teniendo en cuenta la complejidad de las vías de transducción de señales involucradas en las respuestas neuroadaptativas del proceso de adicción a drogas de abuso, sería razonable hipotetizar que Cdk5 cumple un papel modulador de la morfogénesis de espinas dendríticas inducidas por la administración de psicoestimulantes, en el cual el aumento de su expresión y actividad provocado por la exposición a estos agentes estaría dirigido a regular sustratos particulares que modulen componentes esenciales que participan de la reorganización y dinámica del citoesqueleto de actina. Siendo la proteína Pak, el candidato sobre el cual centraremos nuestra atención.

2

Objetivos

2.1 Objetivo general

Obtener nuevas evidencias acerca de la participación de Cdk5 y sus activadores específicos p35 y p25 en relación a componentes claves de la regulación de la dinámica de actina los cuales serían los responsables en promover el efecto espinogénico provocado por la administración de psicoestimulantes. Enfocaremos nuestra atención en la región del hipocampo y particularmente en el estudio de proteínas capaces de interaccionar directa o indirectamente con Cdk5.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Caracterizar el efecto espinogénico provocado por la administración de anfetamina en condiciones "in vivo", "ex vivo" e "in vitro".
- 2- Determinar la participación de Cdk5 y sus activadores específicos, p35 y p25, en la morfogénesis y/o estabilización de las espinas dendríticas inducidas por la acción de psicoestimulantes.
- 3- Caracterizar la función Pak en la morfogénesis de las espinas dendríticas inducidas por la acción de psicoestimulantes.

3

Materiales y Métodos

3.1 Animales de Experimentación

Para los experimentos “*ex vivo*” e “*in vitro*”, se emplearon ratas Wistar criadas en el bioterio del Instituto Mercedes y Martín Ferreyra. Los animales fueron alojados en cajas plexiglás y la temperatura de la habitación se mantuvo en 22 °C, con un ciclo de luz oscuridad de 12 hs (8h-20h), y libre acceso a comida y agua.

Para los experimentos “*in vivo*” se emplearon ratones machos de la cepa C57BL/6J transgénicos que expresan la proteína fluorescente verde (eGFP, del inglés) bajo el control de una región modificada del promotor Thy1 (el mismo contiene las secuencias necesarias para la expresión neuronal pero carece de las secuencias requeridas para la expresión en células no neuronales), llamados B6.Cg-Tg(Thy1-EGFP)MJrs/J, donados generosamente por el Dr. Pozzo-Miller. Para el mantenimiento y amplificación de la colonia se realizan cruces de hembras salvajes C57BL/6J (Wild type, WT) con machos heterocigotas B6.Cg-Tg(Thy1-EGFP)MJrs/J.

3.1.1 Genotipificación de Ratones Transgénicos Thy1-EGFP

La genotipificación de los ratones se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico obtenido de una muestra de tejido de la cola del animal. La toma de la muestra de tejido se llevó a cabo dentro de la primera semana después del destete.

3.1.2 Obtención de la Muestra de Tejido

La toma de la muestra de tejido se realizó en animales anestesiados con una dosis de 90 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilazina diluidas en solución salina estéril (Sal, NaCl 0,9%), inyectada intraperitonealmente (i.p.). El estado de anestesia profunda se comprobó mediante la ausencia de un reflejo flexor al ejercer una pequeña presión en el extremo de la cola del animal. A continuación, mediante un bisturí estéril se cortó una muestra de aproximadamente 2-3 mm del extremo de la cola del ratón, e inmediatamente se cauterizó dicha zona. Con los animales aún anestesiados, estos fueron numerados mediante pequeñas incisiones en las orejas para su futura identificación.

3.1.3 Extracción y purificación del ADN genómico

La extracción del ADN genómico a partir de la cola de los ratones se llevó a cabo mediante la digestión del tejido y la posterior purificación del ADN. La digestión se realizó mediante la enzima Proteínasa K (Promega, Oregon, EEUU). Las muestras de tejido fueron colocadas en un microtubo estéril tipo Eppendorf, con 500 µl del buffer de digestión (200 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8,5, 2% SDS y 5 mM EDTA pH 8) al cual se le agregó 0.2 µg de Proteínasa K disuelta en 10 mM CaCl y 50 mM Tris (pH 8) y se incubaron a 55 °C durante toda la noche.

A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 14.000x g a 4 °C durante 10 min, obteniéndose una fase acuosa y un precipitado conteniendo los restos de tejidos no digeridos. La fase acuosa conteniendo el ADN se transfirió a otro microtubo y se le agregó un volumen igual de isopropanol frío; seguido de esto, la muestra se agitó suavemente hasta observar la formación de un pequeño precipitado. Esta muestra se centrifugó nuevamente a 14.000x g a 4 °C durante un periodo de 10 min y se descartó el sobrenadante, quedando el precipitado de ADN adherido al fondo del tubo. El precipitado se lavó con etanol 80% centrifugándolo 5 min a 14.000x g a 4 °C y eliminando el sobrenadante; este paso se realizó dos veces, el primero con 500 µl de etanol y el segundo con 200 µl. A continuación, se dejó secar el ADN durante 30 min y luego se

agregaron 50 µl de H₂O MilliQ[®] autoclavada y se incubó la muestra durante 30 min a 37 °C, con el fin de facilitar la resuspensión del ADN. La muestra se guardó a -20 °C hasta su utilización.

3.1.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para determinar el genotipo de los animales se realizó una reacción por cada muestra. En la misma se utilizaron cuatro “*primers*” o cebadores, dos de ellos reconocen al transgen y los otros dos reconocen un control interno positivo. El primer para el transgen denominado “*foward*” 14994 (5'-TCT GAG TGG CAA AGG ACC TTA G-3') hibridiza con el promotor del Thy-1 y el primer para el transgen denominado “*reverse*” 14995 (5'-TGA ACT TGT GGC CGT TTA CG-3') hibridiza con la secuencia que codifica para eGFP, esta reacción produce un fragmento de aproximadamente 173 pares de bases (pb). Mientras que los siguientes “*primers*” reconocen a un control interno positivo: “*forward*” oIMR7338 (5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3') y el primer denominado “*reverse*” oIMR7339 (5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C- 3') esta reacción produce un fragmento de aproximadamente 324 pb. Esta reacción no diferencia animales heterocigotas de homocigotas.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 30 µl, conteniendo 25 mM MgCl, 10 mM dNTPs, 20µM de cada primer (Transgen F/R y Control interno positivo F/R), 5 unidades de Taq polimerasa y 1 µl de ADN. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador estándar de acuerdo al siguiente programa: 1-desnaturalización inicial: 1,5 min a 94 °C; 2-desnaturalización: 30 segundos a 94°C, 3-hibridización:1 min a 60 °C; 4-elongación: 2 min a 72 °C y 5-Elongación final: 2 min a 72 °C. Las etapas 2 a 4 se repitieron por 35 ciclos.

Los productos de PCR se revelaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 2 % en Buffer TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA). Para la visualización de las bandas se les agregó a los productos de PCR una solución de Gel-red (Biotium) acorde a las especificaciones del fabricante. La presencia de las bandas de los productos de amplificación fueron detectadas mediante un transiluminador UV.

3.2 Cultivos Primarios Hipocampales

3.2.1 Cultivo Organotípico de Hipocampo

Los cultivos organotípicos de hipocampo fueron realizados utilizando hipocampos de ratas Wistar de entre 7-10 días post-natales. Brevemente, los animales son anestesiados, decapitados y sus cerebros son removidos y colocados en una solución fría de HBSS (HANK'S 10X [1X] Invitrogen, d-glucosa 2.77M [41.55mM], Penicilina/Estreptomicina 100X [1X], H₂O MilliQ®). Bajo condiciones estériles, se disecan los hipocampos y se realizan cortes coronales de 400 µm de espesor con un "tissue slicer" (Siskiyou, MX-TS tissue slicer). Posteriormente los cortes son ubicados sobre el inserto de membrana (insertos de cultivo de tejido Millicell-CM, diámetro 30mm, poro 0.4 µm, Millipore) y transferidos a cápsulas de Petri conteniendo 1 ml de medio de cultivo (Neurobasal-A / 20% Suero de caballo / 2% B-27, Invitrogen).

- **Mantenimiento**

A partir del cuarto "día *in vitro*" (DIV) se va reduciendo paulatinamente la cantidad de suero de caballo, primero al 10%, el quinto DIV se cambia el medio por uno con 5% de Suero y el sexto día es medio libre de suero. Los cultivos de cortes se mantienen en un incubador con control activo de la humedad, a 36°C con 5% de CO₂ y 95 % de humedad, y el medio se reemplaza 2 veces por semana.

3.2.2 Cultivo de Neuronas de Hipocampo Disociadas

Los cultivos primarios de hipocampo se realizaron según protocolo de Kaech S. and Banker G., 2006, (Kaech y Banker 2006) utilizando hipocampos de embriones de ratas Wistar de 18 días de gestación (E18). Las ratas preñadas fueron anestesiadas en una cámara de CO₂ y posteriormente sacrificadas mediante dislocación cervical. Los embriones fueron removidos de la cavidad abdominal, colocados en una cápsula de Petri estéril y decapitados. Las cabezas de los embriones fueron colocadas en una cápsula de Petri estéril en solución tampón HBSS. Bajo lupa y mediante el empleo de instrumental

quirúrgico para microdissección se procedió a obtener los hemisferios cerebrales, liberarlos de sus meninges y a la disección de los hipocampos. Los hipocampos obtenidos fueron colectados en un tubo estéril e incubados durante 15 min en una solución de tripsina 0,25% (Gibco 15090-046) en HBSS a 37°C en un baño termostático. La incubación enzimática se detuvo duplicando el volumen de incubación con medio de siembra (MEM [1X], Suero de Caballo [10% vol/vol], Piruvato [1X], Glutamax 100X [1X], Penicilina/Estreptomicina 100X [1X]), el tejido nervioso se precipitó mediante centrifugación leve y fue resuspendido en medio de siembra. El tejido tripsinizado fue disociado mecánicamente mediante el pasaje sucesivo por 3 pipetas Pasteur de diámetro decreciente.

Finalmente, las neuronas fueron sembradas a una densidad aproximada de entre 5000 a 15000 neuronas por cm^2 en vidrios de 12 milímetros de diámetro previamente tratados con poli-L-lisina (Invitrogen).

- **Mantenimiento**

Durante las 2 primeras horas posteriores a la siembra, los cultivos fueron mantenidos en medio de siembra para permitir la adhesión de las neuronas al sustrato. Posteriormente se reemplazó dicho medio, por medio de mantenimiento (Neurobasal 1X [1X], B27 50X [1X]). Desde la siembra hasta el momento de fijación los cultivos fueron mantenidos en un incubador a 37°C y con 5% de CO_2 .

- **Sustrato para los Cultivos**

Los cubreobjetos de vidrio fueron tratados con solución de ácido nítrico 70% (peso/volumen) durante 18–24 horas. Luego fueron lavados 8 veces en un periodo de 4 horas con H_2O MilliQ®, esterilizados mediante calor seco a 225°C durante 6 horas. En una mesa de flujo laminar, los vidrios fueron tratados con poli-L-lisina (1 mg/ml, peso molecular 30-70 kDa, Sigma, disuelta en solución tampón borato 0.1M pH 8.5) durante 12 horas a temperatura ambiente. Luego del tratamiento con poli-L-lisina se lavaron los vidrios con H_2O MilliQ® estéril durante 4 horas y finalmente se agregó medio de siembra al menos 2 horas antes de realizar la siembra de las neuronas.

Para los experimentos bioquímicos, el piso de la cápsula de Petri fue tratado con poli-L-lisina, como fue descrito anteriormente.

3.3 Transfecciones

3.3.1 Transfecciones de Cultivos Organotípicos de Hipocampo: Biolística

En primer lugar se precipitó el ADN plasmídico con las partículas de oro (diámetro 1,6 μm , BioRad) en una proporción de 2 μg ADN por μg de oro. El complejo ADN-oro quedo recubriendo un tubo de Tefzel mediante la utilización de Polivinipirrolidina a una concentración final de 0,06 mg/ml. Posteriormente se cortaron segmentos del largo adecuados para ser introducidos en la pistola de helio (GENGUN, BioRad) y los cultivos de tejido fueron disparados a 200 psi.

Los cultivos de 7 DIV fueron transfectados biolísticamente con la proteína fluorescente amarilla aumentada (eYFP, enhance Yellow Fluorescent Protein, del ingles) para la correcta visualización de las espinas dendríticas o co-transfectados con algunos de los plásmidos que se mencionarán en el apartado siguiente. Previamente a la tranfección, el medio de cultivo de los tejidos mantenidos *in vitro* fue reemplazado por medio sin suero con antibióticos (Neurobasal-A / B-27, Penicilina/Estreptomina 100X [1X]). Una vez transfectados, los cultivos se volvieron a colocar en incubador a 36°C con 5% de CO₂ y 95 % de humedad. Al día siguiente de la tranfección se reemplazó el medio por medio sin antibiótico.

3.3.2 Transfecciones de Cultivos de Neuronas de Hipocampo Disociadas

Se utilizó el método de Lipofectamina 2000, ampliamente empleado en nuestro laboratorio.

Se preparo una solución con 250 μl de Opti-MEM (Invitrogen) más 8 μl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se dejo reposar durante 5 min a temperatura ambiente.

Por otro lado se preparó una solución de 50 µl de Opti-MEM mas 1 µg de ADN plasmídico de eYFP. Al cabo de 5 min se mezclaron las soluciones y se dejó a temperatura ambiente durante 20 min adicionales. Luego de los 20 min de incubación, se retiró y guardó a 37°C el medio de mantenimiento de las neuronas y se cambió por 1,5 ml de Opti-MEM a 37°C. Se agregó la solución de lipofectamina/DNA a la cápsula con las neuronas y se mantuvo en el incubador húmedo durante 45-75 min. Una vez cumplido el tiempo indicado se retiró el medio Opti- MEM/ADN/Lipofectamina de las neuronas, se restituyó el medio condicionado inicial y se volvieron a colocar en el incubador. En caso de que el volumen de medio no fuera suficiente se agregó medio de mantenimiento nuevo hasta completar 1,5 ml de medio por cada cápsula de 35 mm de diámetro.

3.3.3 Plásmidos Utilizados

El plásmido de la proteína amarilla fluorescente, eYFP, fue adquirido en Clontech. SiCdk5: pequeño ARN de interferencia para Cdk5, fusionado a una proteína fluorescente roja, desarrollado en nuestro laboratorio. DN-Cdk5: construcción mutante de Cdk5 inactiva, donado generosamente por el Dr. Hind. p35: full length, generosamente donado por el Dr. Miller. p25: constructo realizado en nuestro laboratorio. Pak-CA: construcción mutante de Pak1 constitutiva activa. Pak-KD: construcción mutante de Pak1 quinasa inactiva; ambos donados generosamente por la Dra. Jessica Zareno.

3.4 Fijación

3.4.1 Fijación de los Cultivos

Los cultivos organotípicos fueron fijados con una solución de paraformaldehído 4% (p/v) en PB 200mM (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄). Para ello, se retiró el medio de cultivo, se les colocó la solución fijadora a 37°C e inmediatamente se los colocó a 4°C toda la noche. Luego se descartó el fijador, se realizaron 3 lavados con PBS (pH 7,2; 0,1 M) y se montó con Vectashield® (Vector laboratories).

Los cultivos primarios, al momento de fijarlos se les retiró el medio de cultivo y se los lavó con PBS 1X a 37°C. Inmediatamente después se retiró el PBS y se agregó el fijador

paraformaldehido 4% (p/v) / sacarosa 4% (p/v) en PBS 1X a 37°C durante 20 min. Finalmente, se descartó el fijador y se mantuvieron las células en PBS 1X hasta el momento de montarlas.

3.4.2 Fijación de los Cerebros

Los ratones fueron anestesiados con una sobredosis de hidrato cloral (0,1 ml / 100 g) y luego de comprobarse que estos se encontraban profundamente anestesiados mediante la ausencia de reflejos flexores, fueron perfundidos transcárdicamente con el fin de fijar el tejido cerebral. En primer lugar y con el objeto de remover toda la sangre del sistema los sujetos fueron perfundidos con una solución lavadora (glucosa 0,4%, sacarosa 0,8%, NaCl 0,8%). A continuación, fueron perfundidos con una solución fijadora de 4% de paraformaldehido (Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich Lab GmbH, Seelze, Alemania) en buffer borato (10mM Na₂B₄O₇, 150 mM NaCl, pH 7.5). Los cerebros fijados permanecieron en la caja craneal envueltos en papel aluminio durante toda la noche a 4°C y luego fueron removidos y colocados en una solución de sacarosa al 30% hasta su total impregnación. Posteriormente, los cerebros fueron seccionados en cortes de 100 µm de espesor utilizando un micrótopo de congelación (Reicher-Jung Hn40, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se montaron sobre portaobjetos con Vectashield®, finalmente se selló con esmalte de uñas transparente para evitar pérdida del medio de montaje, y se almacenó a 4°C hasta adquirir las imágenes confocales.

3.5 Drogas y Tratamientos Farmacológicos

El tipo de anfetamina que se utilizó fue **d-Anfetamina sulfato** (Parafarm, Buenos Aires, Argentina). Para el tratamiento de los cultivos *in vivo* y *ex vivo* se preparó un stock 10 mM de Anf en H₂O MilliQ® estéril, y la concentración de trabajo fue de 100 y 50 µM. Mientras que la Anf para administrar ip fue preparada en solución salina (NaCl 0,9%).

Para la inhibición farmacológica de Cdk5 se utilizó **Roscovitine** 10 µM [Calbiochem (EMD Millipore) solución stock (50 mM en DMSO)].

Para la inhibición del receptor TrkB en cultivos disociados de neuronas

hipocampales se empleó el inhibidor **k252a** (Sigma). La dosis utilizada fue de 100 nM basados en un trabajo del grupo de Ip N. (Zelda H., y col., 2007).

Para la estimulación de neuronas hipocampales, mantenidas *in vitro* (17-18 DIV), con **Glicina** (200 μ M) y Bicuculina (20 μ M) (control positivo para inducir la generación de espinas dendríticas) se utilizó un buffer libre de Mg^{2+} (140 mM NaCl, 1.3 mM $CaCl_2$, 5 mM KCl, 25 mM HEPES y 33 mM glucosa) según lo descrito por Lu y colaboradores 2001 (Lu et al. 2001).

3.6 Adquisición y análisis de imágenes

Se adquirieron imágenes, con microscopia confocal, de dendritas secundarias, terciarias y cuaternarias de neuronas piramidales de CA1 y CA3 en el caso que correspondiere. Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio Olympus FV1000, con un objetivo de 60x. Los cortes ópticos fueron de 0,17 μ m. Posteriormente se evaluó la densidad de espinas dendríticas y se caracterizó la morfología de las mismas.

Las espinas dendríticas fueron identificadas como pequeñas protrusiones que se extendían $\leq 3 \mu$ m desde el eje dendrítico. Estas fueron contadas en proyecciones Z de máxima intensidad usando el programa ImageJ (National Institutes of Health). Se tuvo particular cuidado de contar cada espina solo una vez a través de toda la proyección Z. La densidad de espinas fue calculada mediante la cuantificación del número de espinas por segmento dendrítico y normalizada a 10 μ m de longitud dendrítica (Tyler y Pozzo-Miller 2003).

Las espinas dendríticas fueron clasificadas siguiendo las categorías definidas por Peter y colaboradores (Peters y Kaiserman-Abramof 1969) como “stubby” o “tipo I”, “mushroom” ó “tipo II” y “thin” ó “tipo III”. Cada espina fue incluida en la categoría que le correspondiese basado en las siguientes relaciones específicas: L/dn y dh/dn , donde L es la longitud de la espina desde su base hasta la punta de la cabeza, dn es el diámetro del cuello máximo y dh es el diámetro máximo de la cabeza, como ya ha sido descrito (Harris et al. 1992; Koh et al. 2002). Las espinas “stubby” tienen una longitud similar al diámetro del cuello, la cual es similar al diámetro de la cabeza de la espina, típicamente $\leq 1 \mu$ m

($L \approx d_n \approx d_h$). Las “mushroom” poseen una longitud típica de $\leq 1 \mu\text{m}$ con un diámetro de cuello mucha más pequeño que el diámetro de la cabeza ($d_n \ll d_h$). Generalmente las espinas “thin” son más largas que $1 \mu\text{m}$, lo cual es mucho mayor que el diámetro del cuello ($L \gg d_n$).

La cuantificación y caracterización morfológica de las espinas dendríticas en el experimento realizado con ratones fue llevada a cabo con el programa NeuronStudio (Beta), previamente se deconvolucionaron las imágenes con el programa AutoDeblur (MediaCybernetics, Bethesda, MD, USA).

3.7 Análisis bioquímicos

3.7.1 Preparación de la Fracción Sinaptosomal

En aquellos experimentos en los que se se obtuvieron fracciones sinaptosomales a partir de ratones C57BL/6J, los mismos fueron sacrificados mediante decapitación a diferentes tiempos post última inyección (dependiendo del experimento), el cerebro fue rápidamente removido sobre hielo y se disecó el hipocampo de ambos hemisferios.

La preparación de los sinaptosomas fue realizada de acuerdo a lo descrito por Camilli (De Camilli et al. 1983) con modificaciones menores. El tejido fue homogeneizado en sacarosa fría (0.32 M sacarosa, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA y 3 mM ClMg, pH 7.4) conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatina, y 0.2 mM ortovanadato de sodio) en un volumen final de 600 μl de sacarosa fría con un homogeneizador con émbolo de vidrio dentro de un recipiente de hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 x g por 5 min. El sobrenadante, homogenato total (HT), se volvió a centrifugar a 10000 x g por 20 min para obtener la fracción citoplasmática (FC), el *pelet* resultante se resuspendió en buffer de lisis RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasas (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatina, y 0.2 mM ortovanadato de sodio) y así se obtuvo la fracción sinaptosomal cruda (FS). Las diferentes fracciones fueron sonicadas (30% Amperaje, durante 10 segundos) en hielo. A continuación, se determinó la

concentración de proteínas totales mediante el método de Lowry, utilizando un kit comercial (DC Protein Assay Kit, Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Finalmente, se agregó a las muestras de proteínas una cantidad de buffer de muestra Laemmli 4X (8% SDS, 40% glicerol, 20% 2-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol) equivalente a 0,25 volúmenes de muestra y estas se incubaron durante 5 min a 100°C.

En el caso de la obtención de fracciones sinaptosomales a partir de cultivos disociados de neuronas hipocampales, el procedimiento difirió únicamente en la parte inicial. El medio de cultivo de las cápsulas que contenían las neuronas disociadas, fue removido y se realizó un lavado con PBS estéril a 37°C. Posteriormente se les agregó 150 µl de sacarosa fría con el cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas y la superficie de la cápsula fue raspada con la ayuda de un “scraper” para levantar las neuronas adheridas a ella, este procedimiento fue llevado a cabo sobre un bloque de hielo. Se tomó el material de la cápsula y se lo colocó en un homogeneizador con émbolo de vidrio y a partir de aquí, el procedimiento fue igual al descrito anteriormente para la obtención de la fracción sinaptosomal.

3.7.2 Preparación de las Muestras para Homogenato Total

Las muestras derivadas de cultivos organotípicos se procesaron de la siguiente manera: Las rebanadas provenientes de 3 cápsulas (de una placa de 6 pocillos) sometidas al mismo tratamiento (ya sea control o Anf) fueron unificadas en una muestra. Los explantos de tejido fueron removidos con ayuda de una espátula y homogeneizados en un homogeneizador de vidrio conteniendo 150 µl de RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasas, dentro de un recipiente con hielo.

Las muestras homogeneizadas se centrifugaron durante 15 min a 14.000 x g y se recuperó el sobrenadante. A partir de éste, se determinó la concentración de proteínas totales mediante el método de Lowry, utilizando un kit comercial (Bio-Rad) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. A continuación, se agregó a las muestras de proteínas una cantidad de buffer Laemmli 4X equivalente a 0,25 volúmenes de muestra y estas se

incubaron durante 5 min a 100°C.

3.7.3 Análisis de Western Blot

De las muestras derivadas del fraccionamiento sinaptosomal y homogenatos totales se utilizaron 25 µg de proteína total. Las mismas fueron separadas mediante electroforesis en geles de 10% ó 12%, según correspondiera, de acrilamida/bisacrilamida conteniendo 10% de SDS. La electroforesis se realizó en un buffer conteniendo 25 mM Tris, 192 mM glicina y 1 % SDS, y el gel fue corrido electrofóreticamente a un voltaje constante de 120V, durante aproximadamente 90 min, hasta que el frente de corrida del mismo desapareciera. Una vez finalizada la electroforesis, las muestras fueron transferidas desde el gel a membranas de nitrocelulosa (Bio Rad, Laboratory, Hercules, CA, USA) en un buffer igual al usado en el paso anterior, pero conteniendo 20% de metanol. La transferencia se llevó a cabo durante 90 minutos a un amperaje constante de 270 mA. Una vez transferidas las proteínas, las membranas fueron teñidas con una solución de 0.2% Ponceau S (Sigma Aldrich) y 2% de ácido acético con el fin de visualizar la correcta transferencia y fueron posteriormente lavadas con buffer tris salino (TBS, 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl) hasta que las marcas desaparecieran completamente. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBST (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl mas 0.05 % Tween-20), por 1 hora a temperatura ambiente. Después se las incubó toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario. Al día siguiente las membranas se lavaron 3 veces con TBST cada 15 min y se les colocó el anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo (IRDye 800 anti-conejo IgG y IRDye 680 anti-ratón *-LI COR-*). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente y de 3 lavados con TBTS, se las reveló utilizando el sistema de imagen infrarojo (Odyssey).

Una vez concluida la etapa anterior, se procedió a la remoción de los anticuerpos primarios de la membrana mediante una incubación de 5 min en una solución de 5N NaOH. Luego, la membrana se lavó 5 veces con TBS/Tween y se volvió a bloquear con leche al 5% por una hora a temperatura ambiente. Se volvió a incubar con el anticuerpo primario de interés, de la misma manera que se describió anteriormente. Finalmente la

intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa FIJI (programa código libre para procesar imágenes basado en Image J de National Institutes of Health) o con el sistema de medición de intensidad de bandas del Odyssey para su posterior análisis estadístico.

3.7.4 Anticuerpos

Anti-Cdk5 (1:500, C-8; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-p35 (1:400, C-19; Santa Cruz Biotechnology), anti-PSD-95 (1:1000, #2507; Cell Signalling), anti- α -tubulin (1:3000, DM1A; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-DAT (1:750, Millipore), anti-TrkB (1:1000, (H-181): sc-8316, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), pTrkB (1:1000, ab81288; Abcam).

3.8 Procedimientos

3.8.1 Experimentos *ex vivo*: Cultivos Organotípicos de Hipocampo

A partir de los 7 DIV el medio de cultivo en el cual se mantienen los explantos, se encuentra libre de suero de caballo. En este momento, fueron transfectados biolísticamente con el o los plásmidos de interés. Al DIV 8, el medio de cultivo fue reemplazado por uno conteniendo Anf 50 μ M o 100 μ M ó Vehículo (Veh), ésto último se repitió el DIV 9. Finalmente el DIV 10 los cultivos fueron fijados y montados, para aquellos experimentos en los que se adquirieron imágenes confocales.

Para los experimentos de ensayos bioquímicos los cultivos simplemente fueron tratados con Anf o Veh los DIV 8 y 9, y el DIV10 fueron procesados para ensayos bioquímicos.

En aquellos experimentos en los que se inhibió farmacológicamente la actividad de Cdk5 con Roscovitine, los cultivos fueron incubados con el inhibidor 30 min antes de cada tratamiento con Anf y dicho fármaco permaneció en el medio de cultivo durante todo el tratamiento con Anf.

3.8.2 Experimentos *in vitro*: Cultivo Primario de Neuronas de

Hipocampo

El DIV 14 las neuronas fueron transfectadas con eYFP. Con el fin de que todas las neuronas fueran procesadas el DIV 17, el tratamiento con Anf de 48 horas comenzó el DIV 15 mientras que para los tiempos de tratamiento con Anf mas cortos (15min, 30 min ó Veh) se comenzó el DIV 17. Finalmente los cultivos fueron fijados y montados, para aquellos experimentos en los que se adquirieron imágenes confocales.

En los experimentos en los que se inhibió a los receptores TrkB con k252a, se procedió de la misma manera que lo mencionado arriba, tratando con dicho fármaco 30 min antes de la exposición a Anf.

Para los ensayos bioquímicos de Western blot, se realizó el mismo procedimiento descrito arriba, con la excepción de que los cultivos no fueron transfectados.

3.8.3 Experimentos *in vivo*: Protocolo de dos Inyecciones

Para los experimentos *in vivo* se emplearon ratones machos de 33 a 40 días de edad de la cepa C57BL/6J transgénicos llamados B6.Cg-Tg(Thy1-EGFP)MJrs/J. Los animales fueron habituados al bioterio de experimentación por lo menos 1 semana antes de comenzar la manipulación de los mismos. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en el ciclo de luz en habitaciones designadas para tal fin, aisladas de disturbios ambientales exteriores. Para dichos estudios se emplearon ratones machos, los cuales se dividieron en cuatro grupos: Sal/Sal, Sal/Anf, Anf/Sal y Anf/Anf. El protocolo de administración consta de dos fases. En la fase 1 o día 1, los animales fueron administrados con una inyección i.p de 4 mg / kg de Anf, en un volumen de 100 µl por cada 10 g de ratón, o un volumen equivalente de Veh (Sal, NaCl 0,9%) y fueron inmediatamente colocados en el ambiente novedoso (campo abierto: caja redonda de 40 cm de diámetro, de paredes plásticas) por una hora, posteriormente regresaron a su jaula hogar. Luego de un día sin recibir tratamiento los animales recibieron una inyección de solución salina ó de Anf (Fase 2) en el contexto novedoso en el cual permanecieron por 1 hora. Posteriormente los sujetos fueron anestesiados y perfundidos 1 hora o 4 horas post-

inyección.

Fase 1 (día 1)	Fase 2 (día 3)	n
Sal	Sal	4
Sal	Anf	4
Anf	Sal	4
Anf	Anf	4

Tabla 1. Esquema de protocolo de administración de dos inyecciones.

3.9 Análisis Estadístico

Los datos de todos los experimentos realizados en esta tesis se analizaron con el programa Statistic 6.0. Se utilizaron ANOVAs mixtos o entre-grupo, dependiendo las variables de cada diseño experimental. Para realizar comparaciones específicas entre grupos, se utilizó el *test a posteriori* Duncan o Tuckey, según corresponda. Los resultados se representaron gráficamente a través del valor de la media y \pm el error estándar de la media. El umbral de significación estadística se estableció en un valor de $p < 0,05$.

4

Resultados

4.1. Morfogénesis de Espinas Dendríticas Inducidas por Anfetamina en Neuronas Piramidales de Hipocampo

El estudio de la fisiopatología de la adicción a drogas, ha sido clásicamente enfocado en las proyecciones dopaminérgicas mesocorticolímbicas originadas en el VTA que proyectan a NAc y a corteza prefrontal medial. Esto se debe principalmente, a que este circuito es un sustrato crítico para los efectos de reforzamiento e incentivo motivacional de recompensa a las drogas y de otros estímulos naturales (Ikemoto y Panksepp 1999). Mas aún, cocaína y Anf producen alteraciones neuroplásticas persistentes en dicho sistema (Kalivas et al. 1992; Robinson TE 1986; Robinson TE 1993; Vanderschuren y Kalivas 2000; Vezina 2004). Sin embargo, en la última década varios estudios demostraron que los psicoestimulantes también producen alteraciones en otras regiones del cerebro asociadas a órdenes superiores del aprendizaje (Crombag et al. 2005; Ornstein et al. 2000; Schoenbaum G, Saddoris MP, Ramus SJ, Shaham Y 2004). Teniendo estas consideraciones en mente, en el presente trabajo, decimos estudiar la plasticidad sináptica estructural inducida por Anf en el hipocampo, enfocando nuestra atención en la generación de nuevas espinas dendríticas y en su caracterización morfológica, por último indagamos un posible mecanismo que modularía dicho efecto.

4.1.1a Una sola Dosis de Anfetamina es Suficiente para Generar Espinas Dendríticas en Neuronas Piramidales de CA1

Estudios previos desarrollados en un trabajo de tesis doctoral de nuestro laboratorio (Dra. Cecilia Mlewski) develaron que la administración de Anf, en un protocolo de dos inyecciones (PDI) y en un ambiente novedoso es suficiente para inducir sensibilización comportamental acompañada de un prolongado aumento en la expresión de p35 y actividad de Cdk5, en fracciones sinaptosomales de estriado dorsal (Mlewski et al. 2014). Llamativamente, la sola administración aguda de Anf provoca un aumento transitorio de la expresión de p25, a las 4 horas post-inyección al igual que un aumento de la actividad de Cdk5, en sinaptosomas de cuerpo estriado (Mlewski, *et al.* 2008).

Basados en estos resultados y con el objeto de estudiar la plasticidad sináptica estructural en hipocampo asociada a la administración de Anf, ratones transgénicos que expresan eGFP (Thy-1 eGFP) bajo el control de una región modificada del promotor Thy1 fueron tratados con el esquema PDI en un contexto novel (ver materiales y métodos) y sacrificados a las 4 horas post-última inyección, para luego ser perfundidos y con la ayuda de un micrótopo de congelación se realizaron cortes coronales de 100 μm , finalmente las rebanadas obtenidas fueron montadas. Imágenes confocales de segmentos de dendritas apicales provenientes de neuronas piramidales de CA1 fueron obtenidos y la densidad como la morfología de las espinas fueron cuantificados en las diferentes condiciones.

El análisis de los resultados muestran que la administración de Anf, en ambas fases del protocolo de administración (Anf/Anf), provoca un aumento significativo del número de espinas dendríticas comparado con su control que recibió Sal en dichas fases (Sal/Sal). Llamativamente, como se puede observar en la figura 11, la administración de una sola dosis de Anf es suficiente para generar un aumento de la densidad de espinas dendríticas, siendo dicho incremento mayor cuando la droga es inyectada en la fase 2 (Sal/Anf) del esquema de administración ($F(3, 31)=7,6332$, $p<0,001$, test a *posteriori* Duncan).

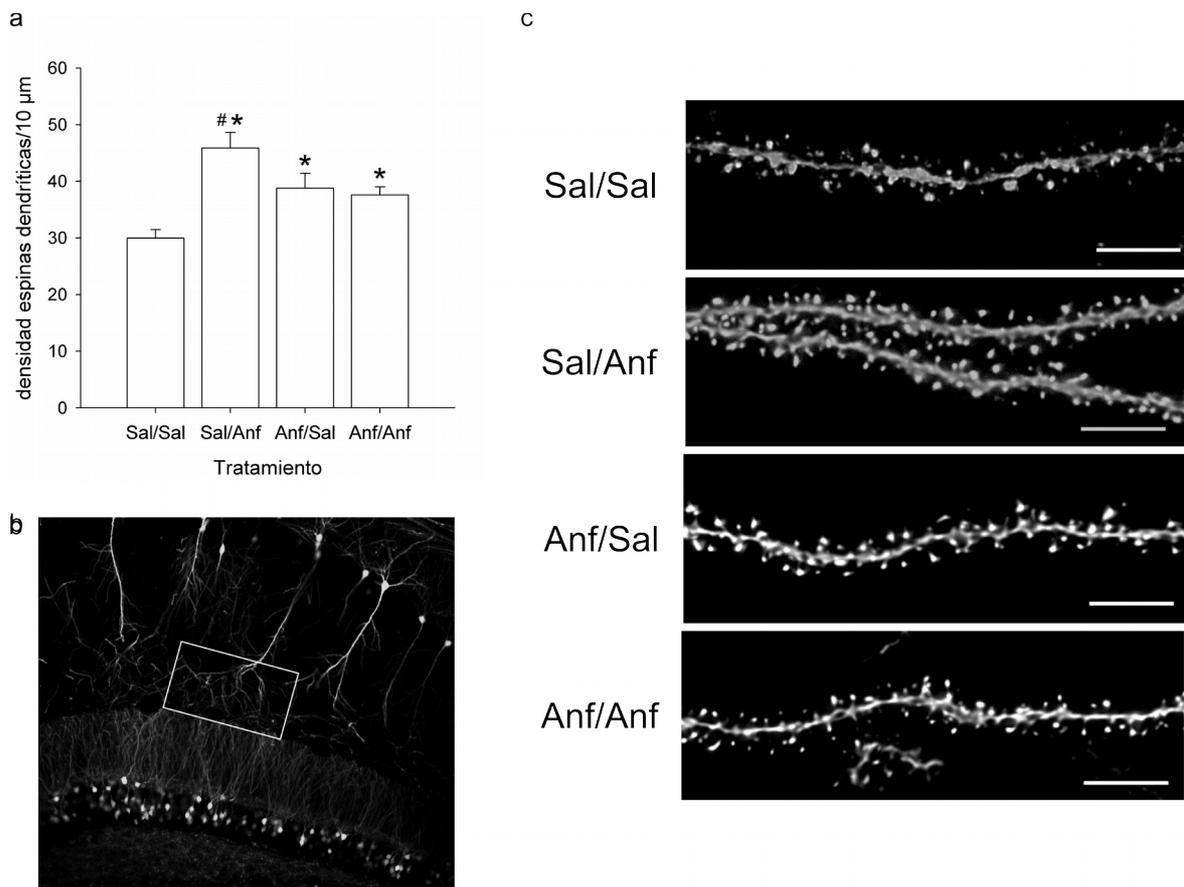


Figura 11. La administración de una inyección de Anf (*in vivo*) es suficiente para generar espinas dendríticas en neuronas hipocámpicas de CA1. (a) Densidad de espinas dendríticas expresada cada 10μm de dendrita apical, bajo los distintos tratamientos. (b) Imagen confocal representativa de la región de CA1 y de sus neuronas piramidales que expresan eGFP, el recuadro que se observa sobre las dendritas apicales, representa la región a partir de la cual se adquirieron imágenes confocales de los segmentos de dendritas. Magnificación 20x. (c) Imágenes confocales representativas, de fragmentos dendríticos de neuronas piramidales de CA1 provenientes de hipocámpicos de ratones administrados con los diferentes esquemas. Magnificación 63x y 2,3 zoom digital. Escala corresponde a 5μm. ANOVA de una vía $F(3,30)=10,304$, $*p<0,0001$ (es diferente del control) y $\#p<0,05$ (es distinto de Anf/Sal y Anf/Anf) las diferencias entre los tratamientos se analizaron con un test a posteriori *Duncan*. Se utilizaron 4 sujetos por grupo y se adquirieron 3 segmentos de dendritas por cada individuo.

4.1.1b Caracterización Morfológica de las Espinas Dendríticas

En un tejido de cerebro fijado, podemos observar varias morfologías de espinas dendríticas, las cuales pueden ser clasificadas en tres tipos, dependiendo en la constricción de su cuello y en el tamaño de su cabeza: “**tipo III**” (“**thin**”) que poseen un estrecho cuello y una pequeña cabeza; las del “**tipo II**” (“**mushroom**”) que poseen un cuello corto y una cabeza relativamente grande; y las “**tipo I**” (“**stubby**”) que no poseen

cuello (Harris et al. 1992; Sekino et al. 2007).

Con el fin de determinar si el aumento de la densidad de espinas dendríticas observada en los ratones Thy-1 luego de la estimulación con Anf son de alguna morfología en particular o si el tratamiento con este estimulante provoca un cambio en la morfología de las espinas ya existentes, caracterizamos a las espinas en los tres tipos morfológicos mencionados anteriormente (“stubby”, “mushroom” o “thin”), utilizando el programa NeuronStudio. En la figura 12 se observa que el tratamiento con Anf en cualquiera de las fases, ya sea **Anf/Anf**, **Anf/Sal** o **Sal/Anf** provoca un aumento significativo del número de espinas dendríticas del tipo “stubby” con respecto a aquellos sujetos que sólo se les administró solución salina en ambas fases (Sal/Sal) ($F(3, 30)=7,3287$, $p<0,001$). Por otra parte, se observa una leve tendencia a aumentar el número de espinas dendríticas del tipo “mushroom” y del tipo “thin” cuando los sujetos son administrados con la droga en alguna fase del protocolo (ANOVA de una vía para “mushroom”: $F(3, 30)=1,8827$, $p=0,1$; y para “thin”: $F(3, 30)=2,4053$, $p=0,09$).

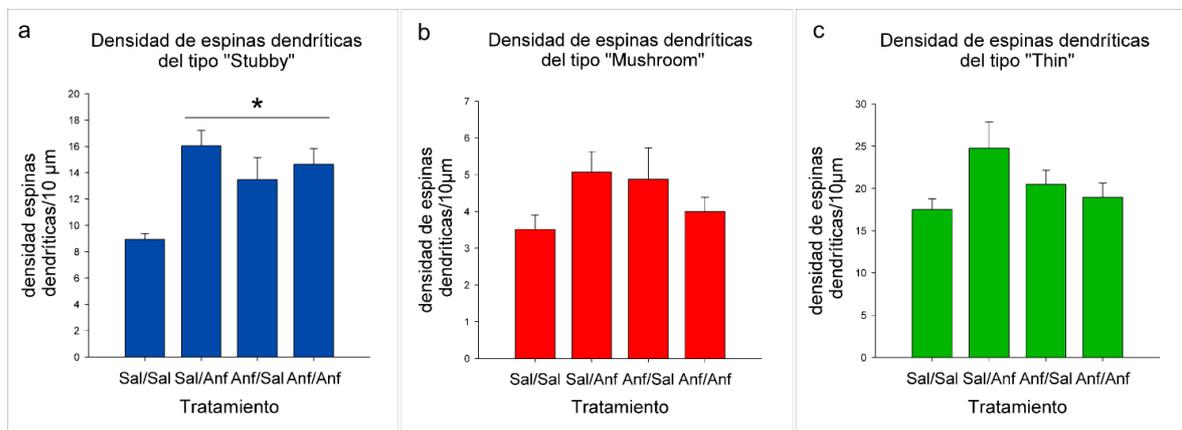


Figura 12. Caracterización de las espinas dendríticas provenientes de neuronas piramidales de CA1 de ratones administrados en un esquema de PDI (condiciones *in vivo*). (a) Densidad de espinas del tipo “stubby”. (b) Densidad de espinas del tipo “mushroom”. (c) Densidad de espinas del tipo “thin”. Expresados cada 10 μ m de dendrita apical de la región de CA1. ANOVA de una vía * $p<0,001$, las diferencias entre los tratamientos se analizaron con un test a posteriori *Duncan*.

4.1.2 Morfogénesis de Espinas Dendríticas Inducidas por la Acción de Anfetamina en Cultivos Organotípicos de Hipocampo

Con el objeto de poder manipular nuestro sistema de estudio de una manera más sencilla que en el animal *in vivo*, decidimos emplear cultivos organotípicos de hipocampo para estudiar posibles vías de señalización que pudiesen estar modulando la morfogénesis de espinas dendríticas inducidas por Anf. Una de las ventajas de utilizar esta metodología es que podemos valernos de estrategias farmacológicas, bioquímicas y de biología molecular para obtener evidencias que nos ayuden a indagar en un posible mecanismo subyacente a la espinogénesis inducida por Anf.

Cabe destacar que para el desarrollo y puesta a punto de los cultivos organotípicos en nuestro laboratorio hemos contado con la extensa experiencia del Dr. Lucas Pozzo Miller (Department of Neurobiology, University of Alabama at Birmingham, USA) quien generosamente puso a nuestra disposición no solo los protocolos detallados del cultivo de cortes sino también su laboratorio en donde realicé gran parte de los experimentos que involucraron este sistema (fig. 11).

El cultivo de rebanadas de tejido de distintas áreas del cerebro es un potente método que permite el mantenimiento de estos explantos de tejido en un sistema que duplica lo más cercano posible la integridad estructural, la proximidad y función de grupos específicos de células *in vivo* (Stoppini et al. 1991). Este tipo de cultivo provee un novedoso enfoque con muchas ventajas y es avalado por numerosos estudios que demuestran que la morfología neuronal, las relaciones celulares y anatómicas y las redes de conexión neuronal se encuentran mantenidas (Noraberg et al. 2005; Sundstrom et al. 2005; Zimmer 1984). Los estudios realizados con este método aprovechan el ambiente aislado y bien definido de las preparaciones *in vitro*, lo cual permite aplicar fácilmente combinaciones de técnicas como biología molecular, electrofisiología, técnicas de imágenes e inmunohistoquímica para el estudio de procesos fisiológicos y patológicos. Asimismo, esta técnica, es ampliamente utilizada como modelo para estudios sinápticos, dado que permite realizar manipulaciones en un preparado donde la citoarquitectura del

tejido se encuentra preservada por largos períodos de tiempo (De Simoni y Yu 2006).

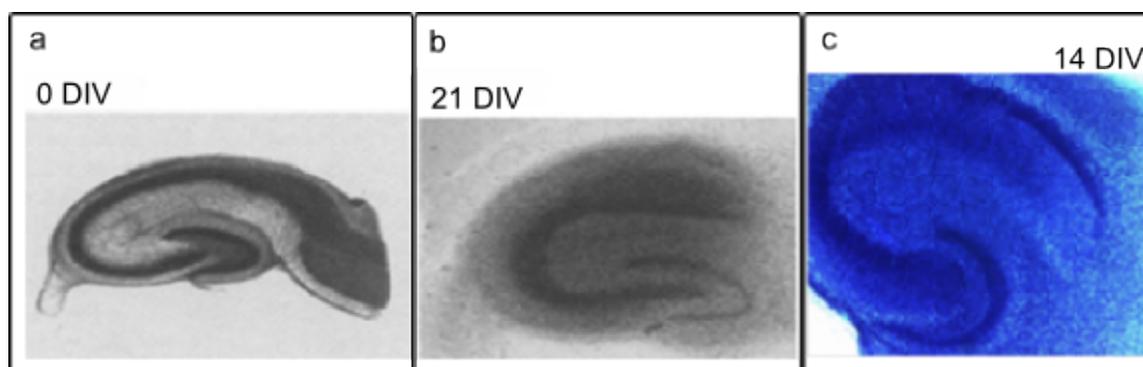


Figura 13. Imágenes de rebanadas coronales de Hipocampo de: (a) 0 DIV y (b) 21 DIV. (c) Cultivo organotípico, teñido con Nissl de 14 DIV. Las imágenes “a” y “b” fueron extraídas de Peter J. Bergold and Patrizia Casaccia-Bonnel, 1997 y “c” de nuestro laboratorio.

4.1.2a Efecto Espinogénico Provocado por la Acción de Anfetamina en Dendritas Apicales de Neuronas Piramidales de CA1 y CA3 Provenientes de Cultivos Organotípicos de Hipocampo

Inicialmente y con el fin de estudiar la espinogénesis inducida por Anf, realizamos ensayos con dos dosis de Anf no citotóxicas 50 y 100 μM . A partir de estos resultados seleccionamos la dosis del psicoestimulante que fuese mas sensible sobre la espinogénesis, para desarrollar el resto de nuestros experimentos propuestos. Asimismo, evaluamos el efecto sobre la plasticidad sináptica de estas dosis de Anf en dos regiones del hipocampo CA1 y CA3, para luego enfocar nuestra atención en el área que resultase ser más susceptible a las dosis de Anf empleada.

Para tal fin, cultivos organotípicos de hipocampo fueron transfectados biolísticamente con el plásmido **eYFP**, para poder visualizar las espinas dendríticas, tratadas con 50 y 100 μM de Anf por 48 horas y posteriormente fijados. A partir del análisis de las imágenes confocales de los distintos segmentos dendríticos, observamos que en la región de CA1 ambas dosis del psicoestimulante promueven la formación de espinas dendríticas de manera significativa, con respecto a cultivos organotípicos de hipocampo tratados con vehículo (ANOVA de una vía, $F(2,35)=6,2416$, $p<0,005$, test a *posteriori* Duncan) (fig. 14 a-

c). De forma similar, en la región de CA3 encontramos que ambas dosis de Anf provocan la generación de espinas dendríticas con respecto a sus controles, tratados con vehículo (ANOVA de una vía $F(2, 12)=5,5735$, $p<0,05$, test a *posteriori* Duncan) (fig.14 d-f).

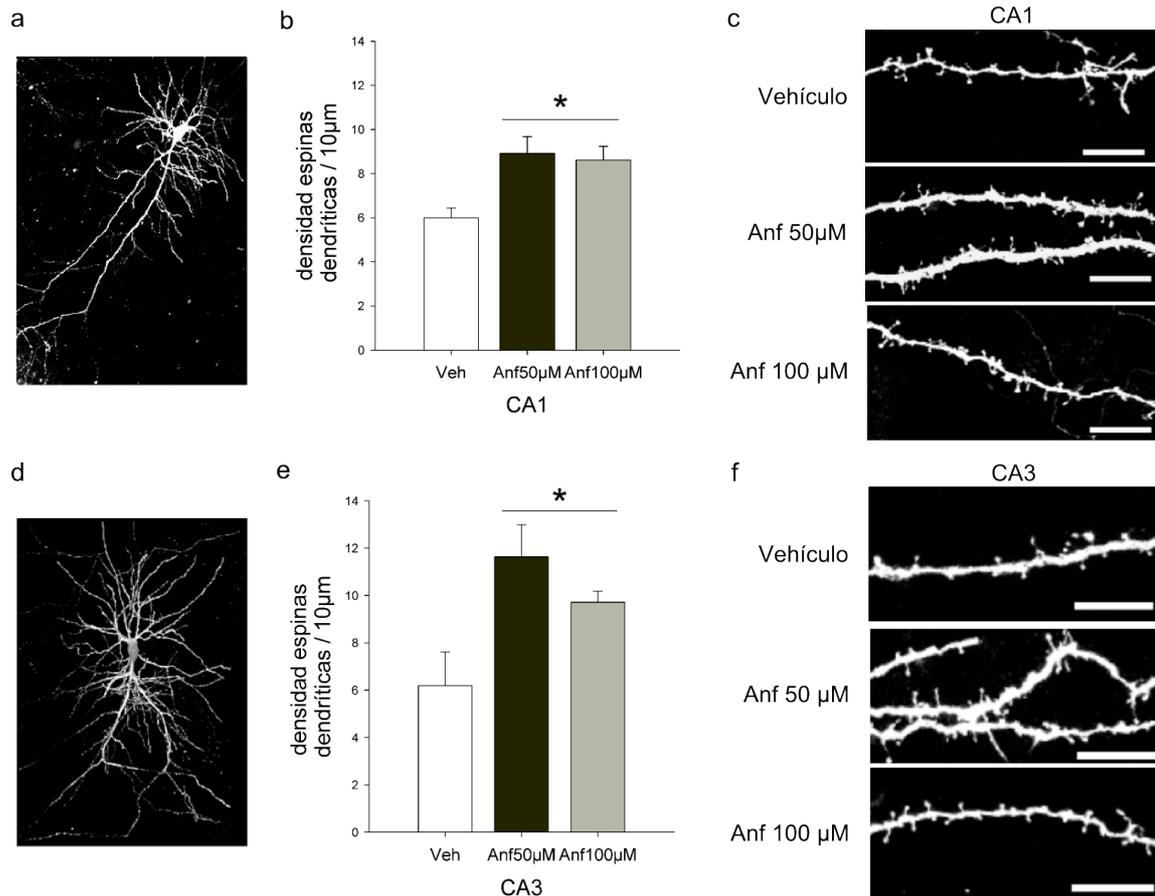


Figura 14: Generación de espinas dendríticas provenientes de dendritas de neuronas piramidales de CA1 y CA3 inducidas por la acción de Anf en cultivos organotípicos de hipocampo. (a) Neurona piramidal de CA1 perteneciente a un cultivo organotípico de hipocampo de 9 DIV tratado con Anf, imagen obtenida a una magnificación de 20x (b) Densidad de espinas dendríticas expresada cada 10µm de dendrita apical. (c) Segmentos dendríticos representativos de neuronas piramidales de CA1 tratadas con vehículo (13 células/5 rebanadas), Anf 50 µM (15 células/6 rebanadas) ó Anf 100 µM (10 células/5 rebanadas), imágenes adquiridas a una magnificación de 100X. (d) Neurona piramidal de CA3 perteneciente a un cultivo organotípico de hipocampo de 9 DIV tratado con Anf, imagen obtenida a una magnificación de 20x (e) Densidad de espinas dendríticas expresada cada 10µm de dendrita apical. (f) Segmentos dendríticos representativos de neuronas piramidales de CA3 tratadas con vehículo (5 células/ 4 rebanadas), Anf 50 µM (5 células/ 5 rebanadas) ó Anf 100 µM (5 células/ 4 rebanadas), imágenes obtenidas a una magnificación de 100X. Análisis de la varianza de una vía (ANOVA) para CA1: $F(2,35)= 6,2416$, $*p<0.005$, para CA3: $F(2,12)= 5,5735$, $*p<0.05$, las diferencias entre los tratamientos se analizaron con un test a *posteriori* Duncan. Barra de escala corresponde a 5µm.

El hecho de haber replicado los resultados obtenidos *in vivo* en nuestros cultivos

organotípicos de hipocampo constituyó la prueba de concepto necesaria para utilizar esta estrategia para abordar el estudio de los mecanismos moleculares de la morfogénesis de espinas dendríticas provocada por la acción de psicoestimulantes.

4.1.2b Caracterización Morfológica de la Espinogénesis Inducida por Anfetamina, en Cultivos Organotípicos de Hipocampo

Los cultivos de rebanadas de hipocampo tratados con ambas dosis de Anf mostraron en la región de CA1 un aumento significativo en la densidad de espinas dendríticas de la morfología “mushroom” (tipo II) con respecto a los cultivos tratados sólo con Veh ($F(2, 35)=4,0320$, $p<0,05$, test a *posteriori* Duncan) (fig 15 a). Asimismo, encontramos una tendencia a elevar el número de espinas del tipo “stubby” (Tipo I), como así también las “thin” (tipo III) con respecto a los cultivos tratados con vehículo, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa (para “stubby” $F(2, 35)=2,8378$, $p=0,07209$; para “thin” $F(2, 35)=1,8660$, $p=,1698$).

En la región de CA3, tanto la dosis de 50 μM como la de 100 μM de Anf provoca un aumento significativo del tipo de espinas “stubby” ($F(2, 12)=9,3235$, $p<0,005$, test a *posteriori* Duncan). Asimismo, se observa una tendencia a aumentar la densidad de espinas del tipo “mushroom”, sin embargo este incremento no es estadísticamente significativo ($F(2, 12)=2,0532$, $p=0,171$). Con respecto a las espinas del tipo “thin” se encontró una tendencia a aumentar el número de espinas sólo con la dosis de 50 μM , mientras que con la dosis mayor de Anf se observa una disminución de este tipo de espinas (para “thin” $F(2, 12)=1,6727$, $p=,228$)(figura 15 b). Resumiendo, en la región de CA3, el tratamiento con Anf 50 μM induce la formación predominantemente de espinas dendríticas del tipo “stubby” y habría una tendencia a aumentar la densidad de espinas del tipo “mushroom” y “thin”. Mientras que al tratar los cultivos organotípicos de hipocampo con la dosis de Anf de 100 μM se observa, un aumento estadísticamente significativo de las espinas “stubby” y una tendencia a incrementar el número de espinas “mushroom” aparentemente en desmedro de la densidad de espinas del tipo “thin”.

A partir de este conjunto de resultados y dado a que no encontramos diferencias

estadísticamente significativas entre las diferentes dosis de Anf empleadas en relación a la generación de nuevas espinas dendríticas, decidimos utilizarla la dosis mas baja de Anf ensayada (50µM) para el resto de los experimentos desarrollados en esta tesis. Asimismo centramos nuestra atención sólo en la región de CA1.

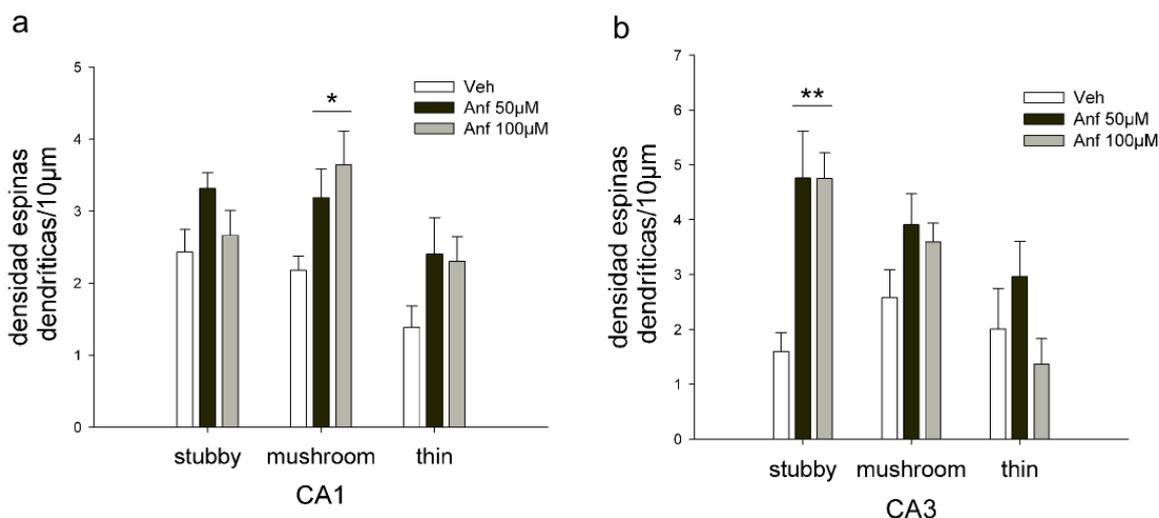


Figura 15. Morfogénesis de espinas dendríticas provenientes de dendritas de neuronas piramidales inducidas por la acción de Anfetamina en cultivos organotípicos de hipocampo. (a) Densidad de cada tipo morfológico de espinas dendríticas, expresado cada 10µm de dendrita apical de la región de CA1. (b) Densidad de cada tipo morfológico de espinas dendríticas, expresado cada 10µm de dendrita apical de la región de CA3. Análisis de la varianza de una vía (ANOVA) , *p<0.05,**p<0.005 las diferencias entre los tratamientos se analizaron con un test *a posteriori* Duncan.

4.1.3 El Tratamiento con Anfetamina Promueve la Generación de Espinas Dendríticas en Cultivos Disociados de Neuronas Piramidales de Hipocampo

Teniendo en cuenta que el tratamiento con Anf es capaz de inducir la formación de nuevas espinas dendríticas tanto en condiciones “*in vivo*” como “*ex vivo*” evaluamos si dicha droga provoca el mismo efecto en neuronas piramidales de hipocampo mantenidas en cultivos disociados, en otras palabras, en condiciones “*in vitro*”. Para tal fin cultivos primarios de hipocampo fueron transfectados con el plásmido **eYFP** y expuestos a una dosis de Anf (50 µM) o a Veh, por 48 horas. Posteriormente, analizamos la densidad de

espinas dendríticas en ambas condiciones. Del análisis de los resultados encontramos que el tratamiento con Anf también promueve la generación de espinas dendríticas en este sistema. Como se puede observar en la figura 16a-e las dendritas de neuronas provenientes de cultivos expuestos a la droga presentan un aumento significativo en la densidad de espinas dendríticas con respecto a las dendritas de neuronas de cultivos tratados con Veh (ANOVA de una vía, $F(1, 22)=16,576$, $p<0,001$).

Las evidencias reunidas hasta el momento en este trabajo de tesis en relación al efecto espinogénico inducido por el tratamiento con Anf, empleando tres metodologías diferentes: **1°** administración de Anf en el ratón "*in vivo*", **2°** tratamiento con Anf sobre cultivos organotípicos de hipocampo "*ex vivo*" y **3°** tratamiento con Anf a cultivos disociados de neuronas de hipocampo "*in vitro*" muestran la solidez de dichos resultados, ya que con todas las aproximaciones empleadas se observa un aumento significativo en la densidad de espinas dendríticas, cuando dichos sistemas son sometidos a Anf.

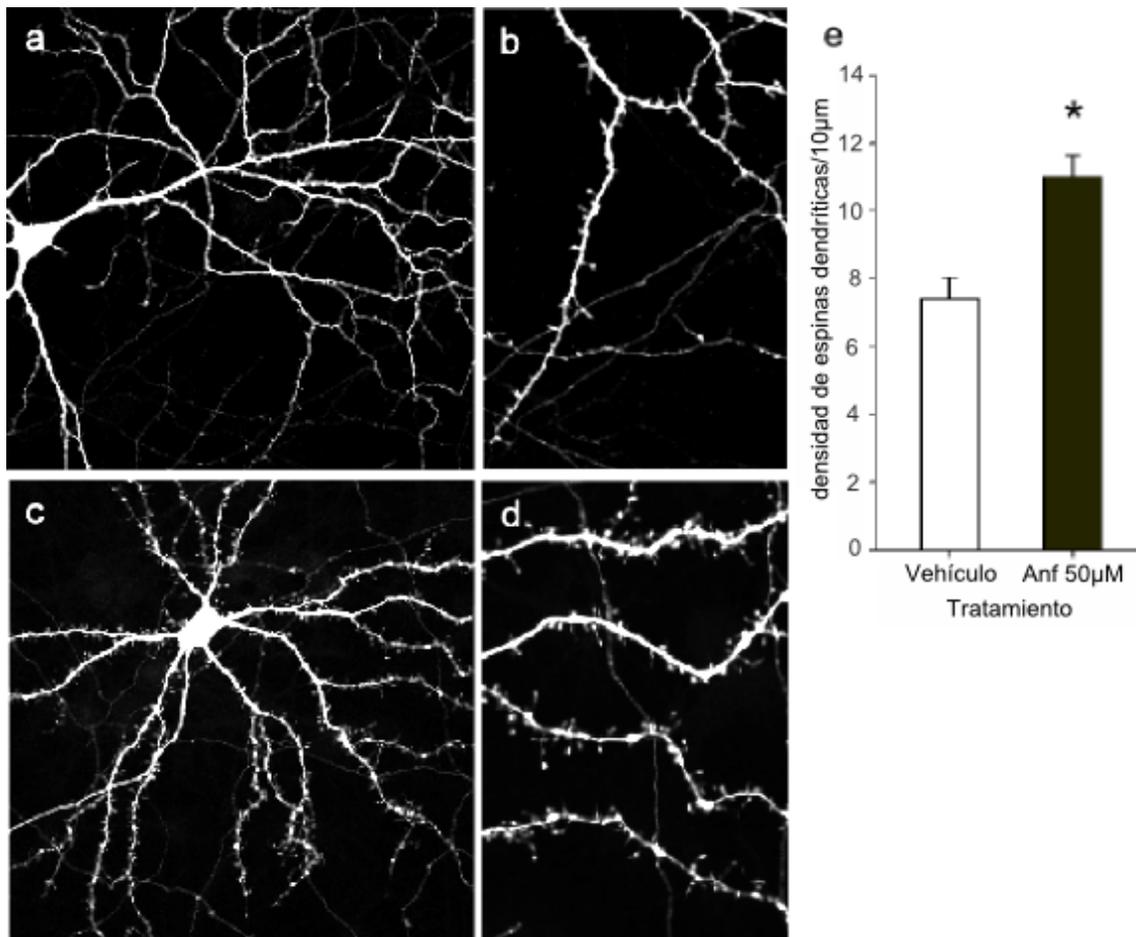


Figura 16. Efecto espinogénico inducido por Anf en cultivos disociados de hipocampo. (a) Imagen representativa de una neurona proveniente de cultivos primarios de hipocampo de DIV 18-19 tratada con Vehículo (13 neuronas de por lo menos 4 cultivos independientes). Magnificación 40x. (b) Fragmento dendrítico de la neurona en la imagen "a". Magnificación 60x. (c y d). Imágenes confocales representativas de una neurona y su dendrita, respectivamente, proveniente de cultivos primarios de hipocampo tratados con Anf 50 μM por 48 horas (14 neuronas de por lo menos 4 cultivos independientes). (e) Densidad de espinas dendríticas expresada cada 10μm de dendrita apical, bajo los distintos tratamientos. ANOVA de una vía, $p < 0,001$, tes a *posteriori* Duncan.

4.2.1 Caracterización de los Niveles de Expresión de Cdk5, p35, DAT y PSD95

Teniendo en cuenta que el tratamiento con Anf provoca un aumento significativo en la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de hipocampo, a continuación evaluamos los niveles de expresión de p35, Cdk5, DAT y PSD95 mediante Western blot en cultivos organotípicos de hipocampo tratados con Anf 50 μM por 48 horas o Veh.

A pesar de que el análisis por Western blot indica un aumento en los niveles de expresión de Cdk5 cuando los cultivos son tratados con Anf con respecto a su control, este incremento no es estadísticamente significativo (test de student, $p > 0,05$) (fig 17b). Sin embargo, observamos un aumento significativo en los niveles de expresión del activador específico de la quinasa Cdk5, p35, con respecto a su control (test de Student, $*p < 0,05$) (fig. 17a). Este resultado es de particular interés ya que el activador de dicha quinasa es el factor limitante de la actividad de Cdk5.

Como es ampliamente conocido, Anf actúa sobre los terminales axónicos de neuronas liberadoras de monoaminas (dopamina, serotonina y norepinefrina) (Berke y Hyman 2000). La Anf sirve como sustrato para el DAT inhibiendo competitivamente la recaptación de DA, a su vez promueve el transporte reverso de la DA a través del DAT y provoca la liberación de las vesículas sinápticas de DA hacia el citoplasma. Estos mecanismos resultan en un dramático incremento de la DA extracelular los cuales se hallan relacionados con las propiedades psicoestimulantes de Anf (Nestler et al. 1999; Sulzer et al. 2005). Con el objeto de caracterizar nuestro sistema de estudio, analizamos los niveles de expresión del DAT. Curiosamente, encontramos que el tratamiento con Anf provoca un marcado aumento en los niveles de dicha proteína con respecto a su control (test de Student, $*p < 0,01$) (fig. 17c).

Finalmente los niveles de expresión de PSD95 provenientes de cultivos tratados con Anf no varían de aquellos cultivos tratados con vehículo (test de Student, $p > 0,05$) (fig. 17d).

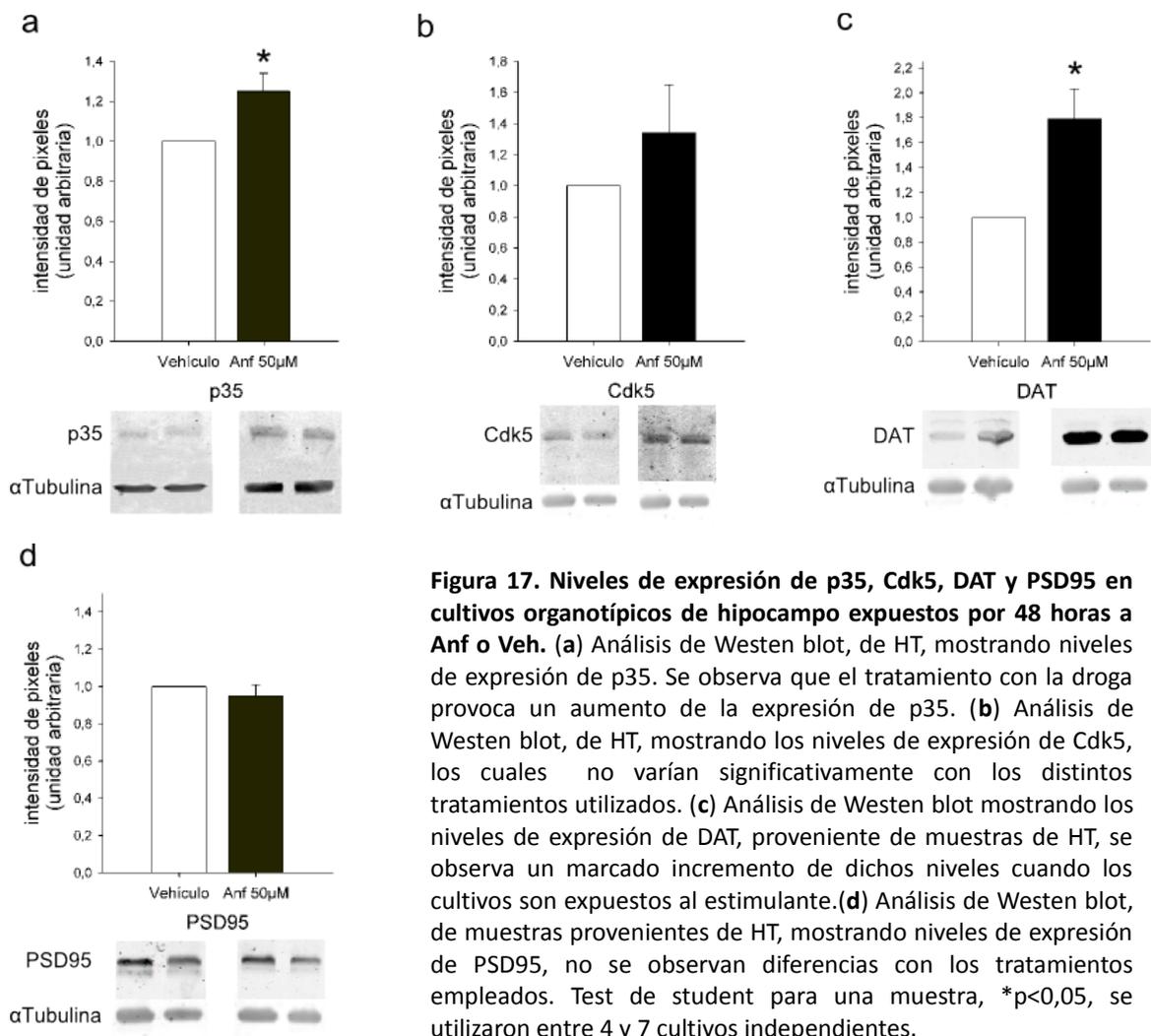


Figura 17. Niveles de expresión de p35, Cdk5, DAT y PSD95 en cultivos organotípicos de hipocampo expuestos por 48 horas a Anf o Veh. (a) Análisis de Western blot, de HT, mostrando niveles de expresión de p35. Se observa que el tratamiento con la droga provoca un aumento de la expresión de p35. (b) Análisis de Western blot, de HT, mostrando los niveles de expresión de Cdk5, los cuales no varían significativamente con los distintos tratamientos utilizados. (c) Análisis de Western blot mostrando los niveles de expresión de DAT, proveniente de muestras de HT, se observa un marcado incremento de dichos niveles cuando los cultivos son expuestos al estimulante. (d) Análisis de Western blot, de muestras provenientes de HT, mostrando niveles de expresión de PSD95, no se observan diferencias con los tratamientos empleados. Test de student para una muestra, * $p < 0,05$, se utilizaron entre 4 y 7 cultivos independientes.

4.2.2a La inhibición de la Función de Cdk5 Previene el Aumento de Espinas Dendríticas Inducidas por Anfetamina en Cultivos Organotípicos de Hipocampo

A partir de los resultados expuestos anteriormente, en los que observamos un aumento en los niveles de expresión de p35 bajo condiciones estimulantes evaluamos si la quinasa Cdk5 estaría participando en la espinogénesis inducida por Anf. Para tal fin, cultivos organotípicos de hipocampo de 7 DIV fueron tratados con tres protocolos diferentes para inhibir la quinasa Cdk5. Dos de dichos protocolos consistieron en bloquear la actividad de la quinasa: mediante la sobre-expresión de la mutante **DN-Cdk5** y a través

de la inhibición farmacológica con **Roscovitine**; el tercer protocolo consistió en disminuir los niveles de expresión de la quinasa, sobre-expresando un **siCdk5** durante el tratamiento con el psicoestimulante o Veh.

De manera interesante, las tres metodologías empleadas previnieron el aumento de la densidad de espinas dendríticas inducidas por Anf (fig. 18)(ANOVA de dos vías, $F(3, 68)=3,6015$, $p<0,05$, test a *posteriori* Duncan). Como se puede ver en la figura 18b, bajo condiciones no estimulantes (Veh) el tratamiento con cualquiera de las tres estrategias para inhibir a Cdk5 no induce cambios en la densidad de espinas dendríticas con respecto a los cultivos organotípicos de hipocampo que solo recibieron vehículo sin bloquear a Cdk5 (**eYFP+Vehículo**) lo que demuestra que Cdk5 participa específicamente en la generación y/o mantenimiento de espinas dendríticas inducidas por el psico-estimulante. Por otra parte, encontramos que la inhibición de la quinasa con cualquiera de las tres metodologías empleadas bajo condiciones estimulantes (Anf) previene la formación de espinas dendríticas inducidas por Anf.

Estos resultados sugieren que es necesario que la actividad de Cdk5 se encuentre intacta para que se produzca el aumento de la densidad de espinas dendríticas inducidas por Anf, en dendritas apicales de neuronas piramidales provenientes de cultivos organotípicos hipocampales.

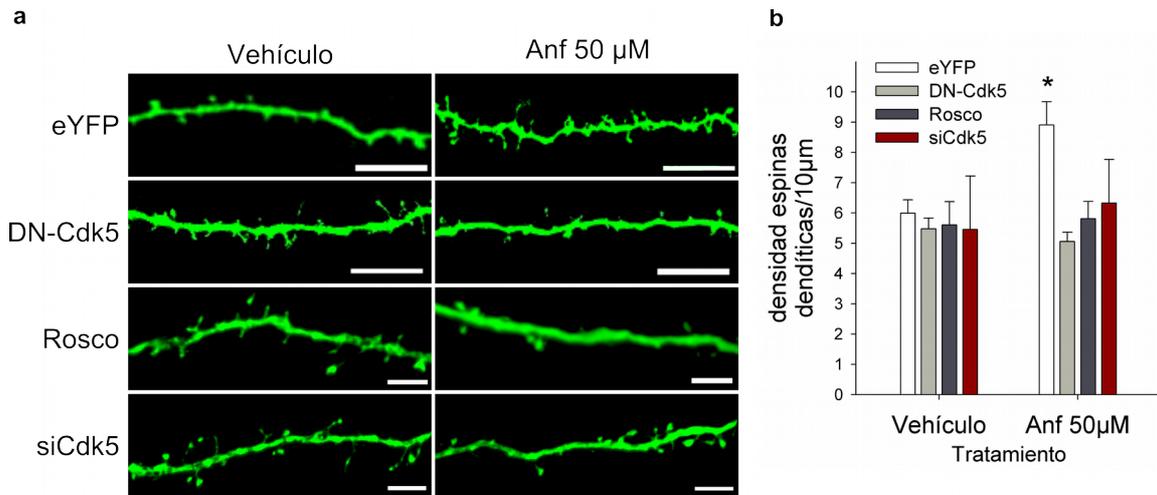


Figura 18. Cdk5 modula la espinogénesis inducida por Anf. Las diferentes metodologías empleadas para inhibir tanto la expresión como la actividad de Cdk5 previenen el aumento en la densidad de espinas dendríticas bajo condiciones estimulantes. **(a)** Imágenes confocales representativas de fragmentos dendríticos de neuronas piramidales de CA1 provenientes de cultivos organotípicos de hipocampo, con las diferentes metodologías empleadas para inhibir a Cdk5. Magnificación 100x. **(b)** Densidad de espinas dendríticas expresada cada 10μm de dendrita apical. ANOVA de dos vías, $F(3, 68)=3,6015$, $*p<0.05$, las diferencias entre los tratamientos se analizaron con un test a *posteriori* Duncan. eYFP+Veh 13 neuronas/7 rebanadas, eYFP+Anf 15 neuronas/7 rebanadas, DN-Cdk5+Veh 14 neuronas/ 7 rebanadas, DN-Cdk5+Anf 16 neuronas/8 rebanadas, Rosco+Veh 4 neuronas/ 4 rebanadas, Rosco+Anf 7 neuronas/4 rebanadas, siCdk5+Veh 3 neuronas/3 rebanadas y siCdk5+Anf 4 neuronas/3 rebanadas.

4.2.2b Caracterización Morfológica de las Espinas Dendríticas

bajo la Inhibición de Cdk5, en Cultivos Organotípicos de Hipocampo

A pesar que se observa una tendencia a disminuir el número de espinas dendríticas del tipo “stubby” (tipo I) tratadas con cualquiera de las tres estrategias para inhibir a Cdk5 con respecto al control (solo **eYFP+vehículo** o **eYFP+Anf**) esta diferencia no es estadísticamente significativa (ANOVA de dos vías, $F(3, 68)=2,5807$ $p>0,05$) como se puede observar en la figura 19a. Por otra parte, las diferentes metodologías para bloquear a Cdk5 previnieron el aumento de espinas dendríticas del tipo “mushroom” (tipo II) inducidas por Anf (ANOVA de dos vías, $F(3, 68)=3,4801$ $p<0,05$) (fig. 19b). Finalmente, la densidad de espinas dendríticas del tipo “thin” no varía de manera significativa con los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías, $F(3, 68)=1,1309$, $p>0,05$) (fig. 19c).

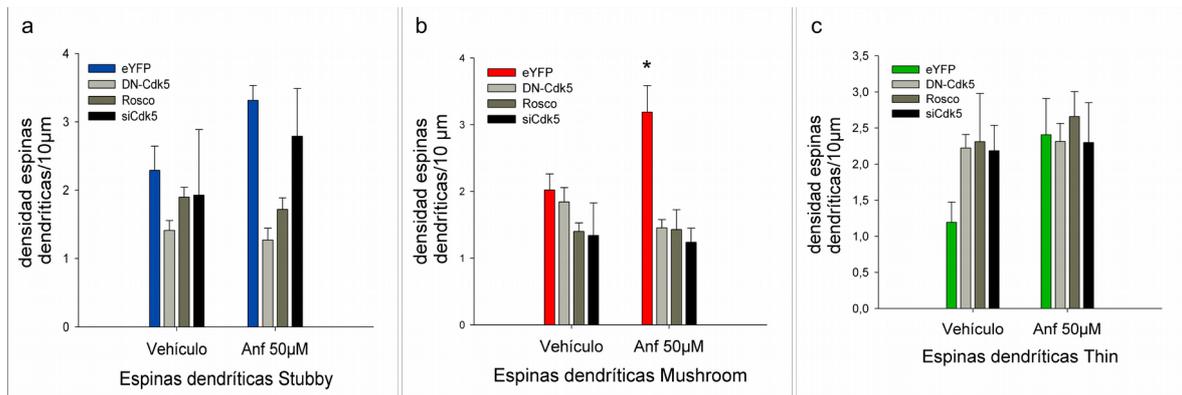


Figura 19. Análisis de la morfología de espinas dendríticas, de dendritas de neuronas piramidales de CA1, provenientes de cultivos organotípicos de hipocampo bajo las diferentes condiciones experimentales: control, DN-Cdk5, Rosco o siCdk5 y en presencia del estimulante (Anf) o ausencia del mismo (Vehículo). (a) Densidad de espinas del tipo “stubby”. (b) del tipo “mushroom”. (c) del tipo “thin”. Expresados cada 10 μm de dendrita apical. ANOVA de dos vías * $p < 0,001$, las diferencias entre los tratamientos se analizaron con un test *a posteriori* Duncan.

4.2.3 Participación de los Activadores de Cdk5, p35 y p25, en la Morfogénesis de Espinas Dendríticas Inducida por la Acción de Anfetamina

Los resultados expuestos hasta el momento demuestran que Anf induce la formación de espinas dendríticas en neuronas piramidales de hipocampo, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* ya sea en cultivos de neuronas hipocampales disociadas como en cultivos organotípicos. Asimismo hallamos que el tratamiento con dicha droga provoca un incremento en los niveles de expresión de p35 y que es necesario que la actividad de Cdk5 este intacta para observar dicha espinogénesis. Nuestro siguiente objetivo fue evaluar la participación de los activadores de Cdk5, p35 y su fragmento proteolítico, p25 en la modulación de dicha plasticidad sináptica inducida por Anf. Para tal fin, nos valimos de cultivos organotípicos de hipocampo que fueron transfectados de manera biolística con el plásmido vacío que expresa **eYFP** o co-transfectados con el plásmido **eYFP** junto con el plásmido **p35** ó con el plásmido **eYFP** junto con el plásmido **p25** y posteriormente tratados con una solución Veh o con Anf por 48 horas.

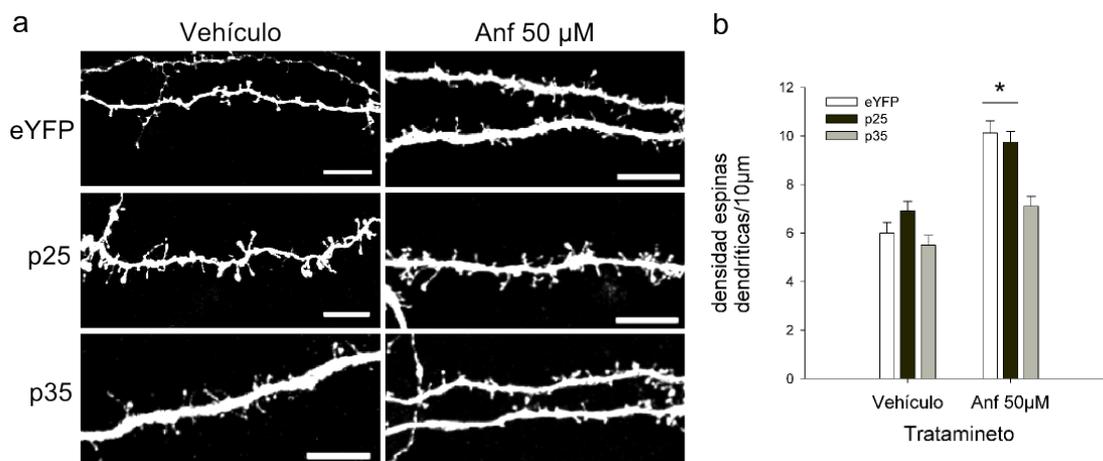


Figura 20. Cdk5 Modula la Espinogénesis Inducida por Anf a través de su Activador Específico p25. (a) Imágenes confocales representativas, de fragmentos dendríticos de neuronas piramidales de CA1 provenientes de cultivos organotípicos de hipocampo, bajo las distintas condiciones experimentales: columna de la izquierda: Vehículo, derecha: Anf 50μM; imágenes superiores: sobre-expresión de eYFP; medio: sobre-expresión p25 e inferiores: sobre-expresión p35. Magnificación 100x. (b) Densidad de espinas dendríticas expresada cada 10μm de dendrita apical, en las distintas condiciones. ANOVA de dos vías, * $p < 0,05$, las diferencias entre los tratamientos se analizaron con un test a *posteriori* Tuckey. eYFP+Veh 13 neuronas/5 rebanadas, eYFP+Anf 12 neuronas/6 rebanadas, p25+Veh 7 neuronas/6 rebanadas, p25+Anf 13 neuronas/8 rebanadas, p35+Veh 8 neuronas/ 7 rebanadas, p35+Anf 13 neuronas/8 rebanadas.

4.2.3a Cdk5 Modula la Espinogénesis Inducida por Anf a través de su Activador Específico p25

Como se puede observar en la figura 20 la densidad de espinas dendríticas de neuronas que sobre-expresan el activador **p35** o **p25** bajo condiciones basales (Veh) no difiere significativamente en relación a su control que sobre-expresa el plásmido **eYFP**.

Por otro lado, al sobre-expresar los activadores de Cdk5, **p35** y **p25**, o sólo el plásmido **eYFP** bajo condiciones estimulantes encontramos que tanto al sobre-expresar el plásmido **eYFP** o co-transfectar **eYFP** junto a **p25** se observa el efecto espinogénico inducido por Anf, mientras que la sobreexpresión de **p35** previene el aumento en la densidad de espinas dendríticas inducidas por la droga (ANOVA de dos vías, efecto de la interacción plásmido*tratamiento, $F(2,60)=3,8051$, $p < 0,05$, test a *posteriori* Tuckey).

Estos resultados sugieren que la participación de Cdk5 en el mantenimiento de las espinas dendríticas generadas por Anf, sería principalmente por su unión al activador p25, ya que al sobre-expresar dicho activador bajo condiciones estimulantes observamos un

aumento en la densidad de espinas dendríticas, mientras que la sobre-expresión de **p35** en dichas condiciones previene el efecto espinogénico inducido por Anf.

4.2.3b Caracterización Morfológica de las Espinas Dendríticas

Al sobre-expresar los activadores específicos de Cdk5, observamos que ambos fueron capaces de prevenir el aumento de la densidad de espinas dendríticas del tipo “stubby” y “mushroom”, bajo condiciones estimulantes, mientras que únicamente la sobre-expresión de **p25** provoca un aumento significativo de la densidad de espinas dendríticas del tipo “thin” bajo ambas condiciones experimentales utilizadas.

El análisis estadístico de la varianza indica que existe un efecto principal tanto de plásmido como de tratamiento y el test a *posteriori* de Tuckey demuestra que la sobre-expresión de cualquiera de los activadores de Cdk5, previene el aumento de la densidad de espinas dendríticas de tipo “stubby” bajo condiciones estimulantes (ANOVA de dos vías, efecto del plásmido, $F(2, 60)=9,7447$, $p<0,001$, y efecto del tratamiento, $F(1, 60)=4,1642$, $p<0,05$) (fig. 21a).

Al sobre-expresar los activadores de Cdk5 bajo los efectos de Anf, encontramos que dichos plásmidos previenen el aumento de espinas dendríticas del tipo “mushroom” inducidas por la droga. Vale la pena destacar, que la sobre-expresión de **p25** en condiciones estimulantes provoca un incremento de espinas dendríticas de dicha morfología con respecto a su control (la sobre-expresión de **p25** en condiciones basales). Asimismo, la sobre-expresión de **p25** en condiciones estimulantes provoca un aumento del número de espinas en relación a la sobre-expresión del activador **p35**, bajo dichas condiciones (ANOVA de dos vías, interacción tratamiento*plásmido: $F(2, 60)=7,9675$, $p<0,001$, test a posteriori Duncan) (fig. 21b).

Finalmente al análisis de la varianza sobre la densidad de espinas dendríticas del tipo “thin” indica un efecto principal tanto del tratamiento como del plásmido y el test a *posteriori* de Tuckey, muestra que la sobre-expresión de **p25** bajo condiciones basales promueve la formación de espinas dendríticas de dicha morfología con respecto al control (sobre-expresión del plásmido que codifica para **eYFP** en condiciones fisiológicas).

Asimismo observamos que Anf induce la formación de espinas dendríticas del tipo “thin” cuando solo es sobre-expresado el plásmido **eYFP**, con respecto a su control (sobre-expresión de **eYFP** en condiciones basales), mientras que al sobre-expresar el plásmido **p25** en condiciones estimulantes se observa un marcado incremento de dichas espinas con respecto a la sobre-expresión de **eYFP** o **p35** bajo dichas condiciones (ANOVA de dos vías, efecto principal del plásmido $F(2, 60)=17,965$, $p<0,00000$, efecto principal del tratamiento $F(1, 60)=17,882$, $p<0,0001$, test a *posteriori* Tuckey) (fig. 21c).

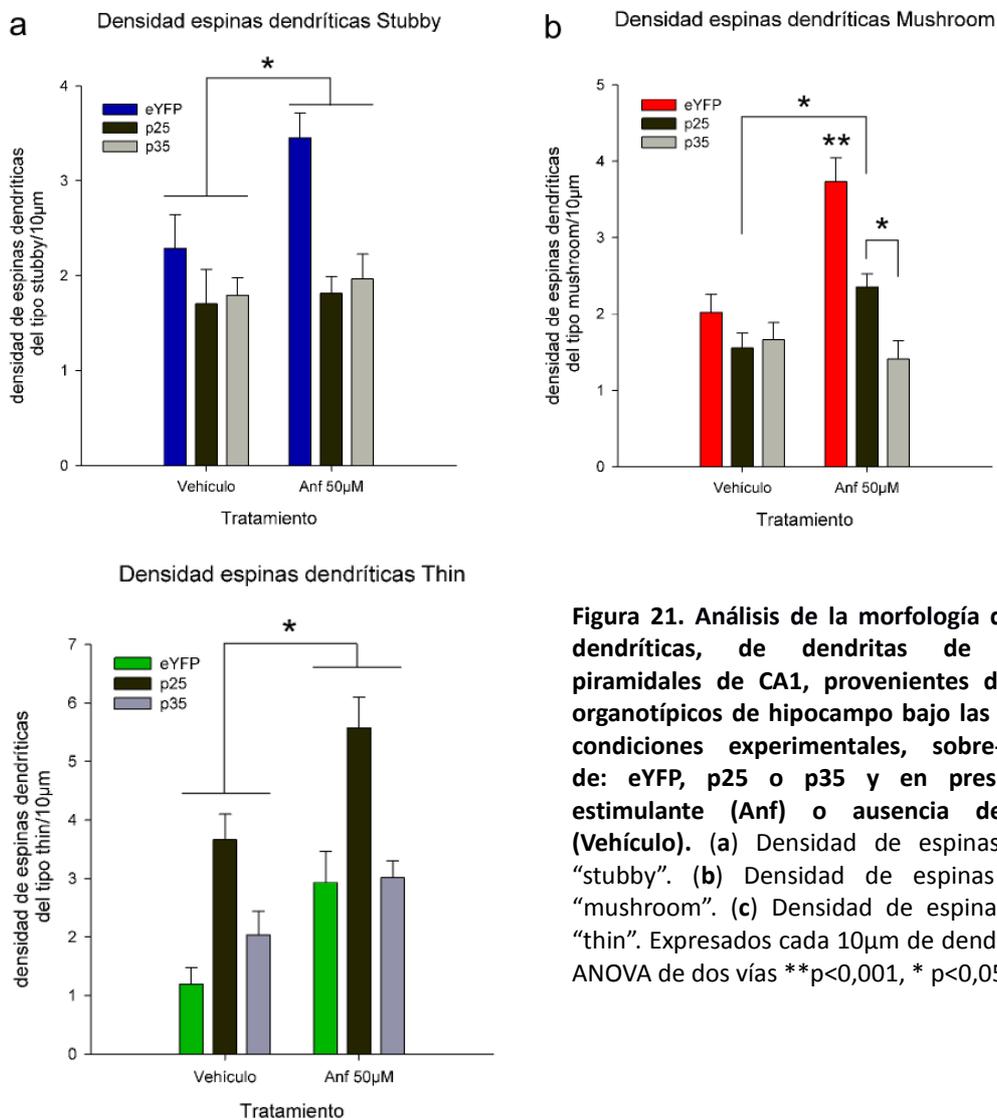


Figura 21. Análisis de la morfología de espinas dendríticas, de dendritas de neuronas piramidales de CA1, provenientes de cultivos organotípicos de hipocampo bajo las diferentes condiciones experimentales, sobre-expresión de: eYFP, p25 o p35 y en presencia del estimulante (Anf) o ausencia del mismo (Vehículo). (a) Densidad de espinas del tipo “stubby”. (b) Densidad de espinas del tipo “mushroom”. (c) Densidad de espinas del tipo “thin”. Expresados cada 10µm de dendrita apical. ANOVA de dos vías ** $p<0,001$, * $p<0,05$.

4.4 Participación de Pak como Efector de Cdk5 en la Espinogénesis Inducida por Anfetamina

Los resultados presentados hasta el momento, nos permiten proponer al complejo Cdk5/p25 como un candidato que regula el efecto espinogénico provocado por la administración de Anf. A su vez, este complejo podría modular sustratos esenciales que participan en la reorganización y dinámica del citoesqueleto de actina.

Como se mencionó en la introducción, las espinas dendríticas son estructuras muy dinámicas y ricas en actina. La reorganización dinámica del citoesqueleto de actina es regulada principalmente por miembros de la familia de Rho GTPasas como Rac (Raftopoulou y Hall 2004). Uno de los efectores de Rac más caracterizados es Pak, quien estimula a Limk1 la cual inactiva a ADF/cofilina a través de su fosforilación, función que tiende a disminuir el recambio de los filamentos de actina (Gungabissoon y Bamburg 2003; Pollard y Borisy 2003). Cdk5 es capaz de regular a Pak de manera dependiente de Rac-GTP. Cuando Pak es fosforilada por Cdk5 en la treonina 212, ésta queda parcialmente inhibida, por lo tanto no es capaz de activar a LimK provocando una mayor actividad de ADF/cofilina, aumentando de esta manera el recambio de los filamentos de actina (Nikolic et al. 1998). En base a estas consideraciones, nos propusimos evaluar la participación de Pak como efector de Cdk5, en la generación de espinas dendríticas inducidas por Anf.

4.4.1a Efecto de la Activación e Inhibición de Pak sobre la Densidad de Espinas dendríticas Inducidas por Anfetamina

Teniendo en cuenta que Cdk5 es capaz de fosforilar a Pak de manera Rac dependiente disminuyendo de este modo su actividad, nos propusimos evaluar si Cdk5 estaría manteniendo las espinas generadas por la acción de Anf, fosforilando a Pak (en la treonina 212) e inhibiendo de este modo, su actividad quinasa. Para tal fin, cultivos organotípicos de hipocampo fueron biolísticamente co-transfectados con el plásmido que codifica para eYFP junto a un plásmido que codifica para una mutante de Pak que es deficiente en su actividad quinasa, **Pak-KD (constructo quinasa deficiente de Pak)**, o con

el plásmido que codifica para **eYFP** junto a un plásmido que codifica para una mutante de Pak constitutiva activa, **Pak-CA (constructo constitutiva activa de Pak)** o simplemente con el plásmido **eYFP** solo, y luego dichos cultivos fueron tratados con Anf ó Veh.

Como se puede ver en la figura 22, no se observan diferencias significativas en la densidad de espinas dendríticas al sobre-expresar los diferentes plásmidos bajo condiciones basales. Mientras que, bajo condiciones estimulantes, encontramos que la sobre-expresión de **Pak-CA** previene el aumento de espinas dendríticas inducida por Anf, situación que emula la inhibición de Cdk5 mediante la cual Pak no se encuentra fosforilada y por ende esta activa.

Por otra parte, al sobre-expresar **Pak-KD** se observa el mismo incremento en la densidad de espinas dendríticas, que cuando solo se sobre-expresa eYFP bajo condiciones estimulantes, emulando de esta manera lo que ocurre cuando Cdk5 esta activa y es capaz de fosforilar a Pak, atenuando la actividad de esta quinasa (ANOVA de dos vías: tratamiento*plásmido, efecto de la interacción: $F(2,39)= 3,8912$ $p<0,05$. Test *a posteriori* de Duncan).

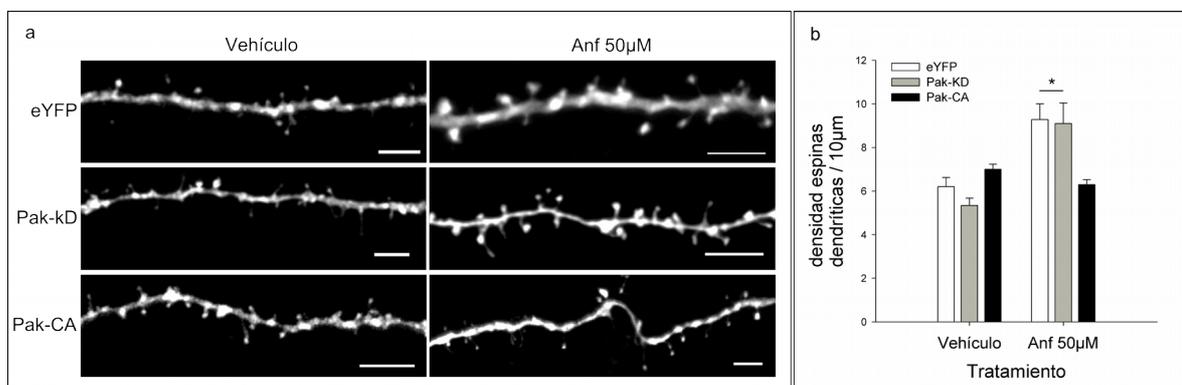


Figura 22. La sobre-expresión de Pak-CA previene el efecto espinogénico inducido por Anf. (a) Imágenes confocales representativas, de fragmentos dendríticos de neuronas piramidales de CA1 provenientes de cultivos organotípicos de hipocampo, bajo las distintas condiciones de tratamiento. Magnificación 63x y 2,3 zoom (b) Densidad de espinas dendríticas expresada cada 10µm de dendrita apical, bajo las distintas condiciones.digital. Escala corresponde a 5µm. ANOVA de dos vías,* $p<0,05$, las diferencias entre los tratamientos se analizaron con un test *a posteriori* Duncan. eYFP+Veh 12 neuronas/8 rebanadas, eYFP+Anf 14 neuronas/8 rebanadas, Pak-KD+Veh 8 neurona/6 rebanadas, Pak-KD+Anf 3 neuronas/3 rebanadas, Pak-CA+Veh 4 neuronas/3 rebanadas, Pak-CA+Anf 4 neuronas/3 rebanadas.

4.4.1b Caracterización Morfológica de las Espinas Dendríticas

Como se puede apreciar en la figura 23a hay una leve tendencia a aumentar el número de espinas dendríticas del tipo “stubby” bajo condiciones estimulantes, sin importar que plásmido se haya sobre-expresado (**eYFP**, **Pak-KD** o **Pak-CA**), con respecto a la sobre-expresión de dichos plásmidos tratados con vehículo.

Por otra lado, observamos una tendencia a incrementar la densidad de espinas dendríticas del tipo “mushroom” al estimular con Anf, solo cuando se sobre-expresa el plásmido **eYFP** o **Pak-KD**; mientras que esta tendencia es prevenida al sobre-expresar **Pak-CA** (fig. 23b), efector similar al encontrado cuando inhibimos la actividad de Cdk5

Finalmente, como se puede observar en la figura 23c, cuando los cultivos son tratados con Anf, existe una tendencia a aumentar la densidad de espinas del tipo “thin” solo en aquellas neuronas que sobre-expresan el plásmido **eYFP** o **Pak-KD** con respecto a sus controles sometidos a condiciones fisiológicas, mientras que este incremento pareciera ser prevenido al sobre-expresar **Pak-CA** bajo dichas condiciones estimulantes.

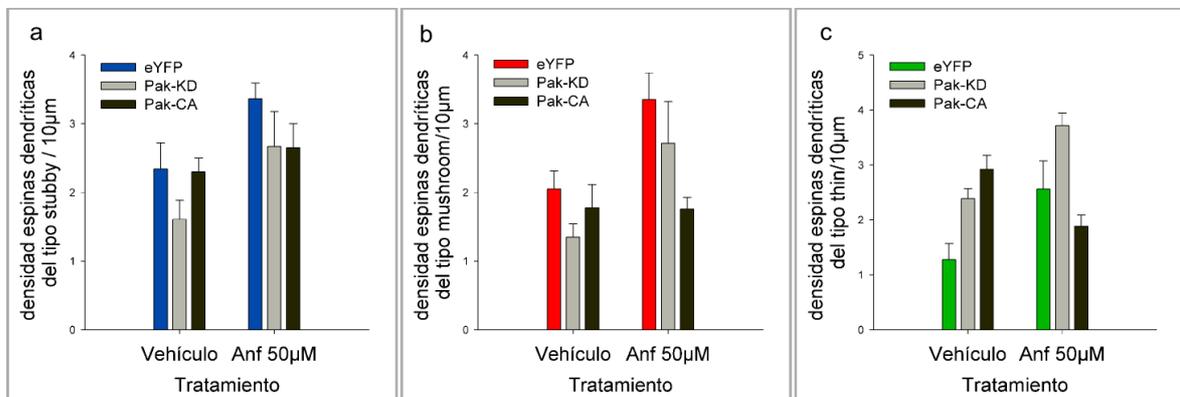


Figura 23. Análisis de la morfología de espinas dendríticas, de dendritas de neuronas piramidales de CA1, provenientes de cultivos organotípicos de hipocampo bajo las diferentes condiciones experimentales, sobre-expresión de: eYFP, Pak-KD o Pak-CA y en presencia del estimulante (Anf) o ausencia del mismo (Vehículo). (a) Densidad de espinas del tipo “stubby”. (b) Densidad de espinas del tipo “mushroom”. (c) Densidad de espinas del tipo “thin”. Expresados cada 10µm de dendrita apical. ANOVA de dos vías.

¿Y ahora como seguimos? ¿Cómo se están generando las espinas inducidas por Anfetamina?

4.5 Determinación de la Participación de BDNF en la Generación de Espinas Dendríticas Inducidas por Anfetamina

Nuestro conjunto de resultados demuestran que el tratamiento con Anf induce la génesis de espinas dendríticas en hipocampo. A su vez, es necesario que la actividad de Cdk5 esté intacta para regular la vía de señalización de Pak, promoviendo la dinámica del citoesqueleto de actina para mantener de esta forma las espinas generadas por la acción del psicoestimulante. ¿Pero cuál sería el mecanismo por el cual Anf esta generando nuevas espinas?

Como se desarrolló en la introducción, existen numerosos trabajos que observan un aumento de la liberación de BDNF cuando se estimula con psicoestimulantes (Le Foll et al. 2005; Meredith et al. 2002; McGinty et al. 2011; Saylor y McGinty 2008). A su vez, la estimulación con BDNF promueve la espinogénesis en cultivos organotípicos de hipocampo (Tyler y Pozzo-Miller 2001; Alonso et al. 2004). Sumado a estos antecedentes es particularmente interesante un estudio reciente, en el que observan que la quinasa Cdk5 fosforila al receptor TrkB en la serina 478, cuando este se encuentra activado por BDNF, y regula de este modo la espinogénesis inducida por la neurotrofina BDNF (Lai y col., 2012).

Sobre la base de estas consideraciones, nos propusimos indagar sobre la participación de BDNF en la generación de nuevas espinas dendríticas inducidas por la acción de psicoestimulantes. Teniendo en cuenta que la modulación a través de factores tróficos constituyen eventos rápidos, en primer lugar evaluamos si el tratamiento por tiempos cortos con Anf es capaz de generar espinas dendríticas. Para ello nos valimos de la estrategia de cultivo de neuronas disociadas de hipocampo donde la acción de la Anf es prácticamente inmediata (a su vez, en este sistema podemos manipular de manera precisa los tiempos cortos de exposición a la droga). Posteriormente analizamos la

participación de BDNF en la espinogénesis inducida por Anf en condiciones *in vitro*. Para tal fin, estudiamos el efecto de la inhibición del receptor tirosina quinasa TrkB en la espinogénesis inducida por Anf en cultivos disociados de neuronas hipocampales. Luego, evaluamos bioquímicamente los niveles de expresión de pTrkB y otras proteínas de interés para este trabajo como TrkB total y truncado (TrkB Tr), p35 y PSD95, en cultivos de neuronas disociadas de hipocampo expuestos a diferentes tiempos de Anf o a vehículo. Finalmente, quisimos estudiar si BDNF participaba en la espinogénesis inducida por Anf en animales inyectados con dicha droga, en un esquema PDI. Luego del esquema de administración PDI, los individuos fueron sacrificados a la hora y cuatro horas pos-última inyección y se obtuvieron muestras de sinaptosomas crudos de hipocampo para realizar ensayos de Western blot y de esta manera determinar los niveles de expresión de pTrkB y otras proteínas de interés.

4.5.1 Caracterización del Efecto Espinogénico Inducido por la Exposición a Tiempos Cortos de Anfetamina, en Cultivos Disociados de Hipocampo

Con el objeto de determinar si el tratamiento por tiempos cortos con Anf es suficiente para generar espinas dendríticas, cultivos de neuronas piramidales de hipocampo fueron transfectadas con un plásmido que codifica para **eYFP** y tratados con Anf por 15 minutos, 30 minutos y 48 horas, posteriormente fueron fijados y se adquirieron imágenes de fragmentos dendríticos para determinar la densidad de espinas dendríticas, como ya se mencionó anteriormente.

En la figura 24b, observamos que a partir de los 30 minutos de tratamiento con Anf hay un aumento significativo del número de espinas dendríticas, con respecto al control tratado con vehículo, y este aumento se mantiene al menos por 48 horas de tratamiento (ANOVA de una vía, $p < 0,001$, test a *posteriori* Duncan).

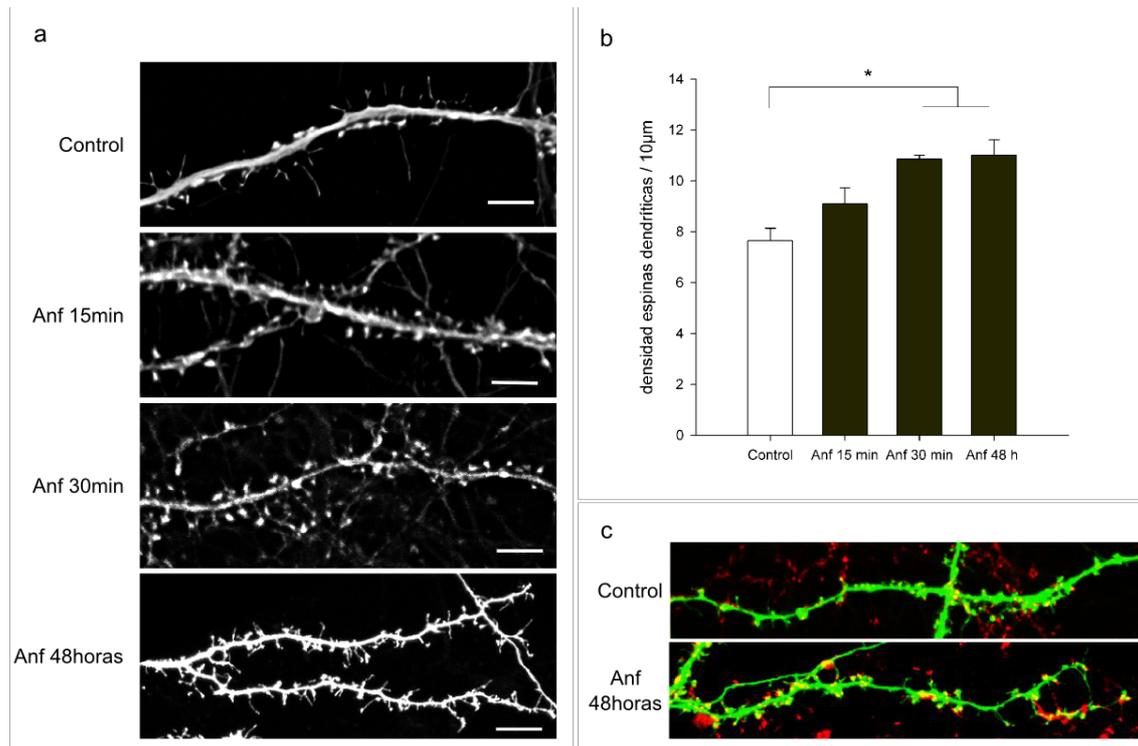


Figura 24. Efecto espinogénico inducido por la exposición a tiempos cortos con Anf en cultivos disociados de hipocampo. El tratamiento con Anf induce la generación de espinas dendríticas a partir de los 30 min de de exposición al estimulante **(a)** Imágenes representativas de fragmentos dendríticos de neuronas, provenientes de cultivos primarios de hipocampo de 18-19 DIV, en los distintos tiempos de tratamiento con la droga o Veh. Magnificación 60x. **(b)** Densidad de espinas dendríticas expresada cada 10µm de dendrita apical, bajo los distintos tratamientos **(c)** Imagen confocal representativa de segmentos de dendritas proveniente de cultivos primarios de hipocampo tratados con Anf 50uM por 48 horas o Veh e inmunomarcados con sinaptofisina (rojo). ANOVA de una vía, $p < 0,001$, test a *posteriori* Duncan.

4.5.2a Determinación de la Participación de BDNF en el Efecto Espinogénico Inducido por Anfetamina, en Cultivos disociados de Neuronas Hipocampales

Con el fin de determinar si el psicoestimulante ejerce su efecto espinogénico a través de la liberación de BDNF, cultivos primarios de hipocampo fueron tratados con un inhibidor farmacológico de los receptores Trk (inhibidor que compite por el sitio de unión al ATP), llamado k252a posteriormente fueron expuestos a Anf por 15 y 30 minutos, o vehículo.

Como se puede observar en la figura 25, el tratamiento con k252a bajo

condiciones fisiológicas no provoca cambios significativos en el número de espinas dendríticas en relación a su control. A los 15 minutos de tratamiento con Anf se observa una tendencia a aumentar el número de espinas dendríticas en ausencia del inhibidor, mientras que en presencia de K252a esta tendencia no se observa. A los 30 minutos de tratamiento con Anf observamos que el inhibidor previene el efecto espinogénico inducido por Anf (ANOVA de dos vías, efecto de la interacción, tratamiento*inhibición TrkB, $F(2, 14)=3,7604$, $p<0,05$ test a *posteriori* de Duncan).

Resultados previos de este trabajo de tesis, donde tratamos por tiempos cortos con Anf, encontramos que el tratamiento con 30 minutos de Anf es suficiente para provocar un incremento significativo en la densidad de espinas dendríticas. El resultado preliminar obtenido en este último experimento, sugeriría que la generación de espinas dendríticas inducidas por Anf sería a través de la liberación de BDNF, ya que al inhibir el receptor de dicha neurotrofina prevenimos el efecto espinogénico inducido por el psicoestimulante.

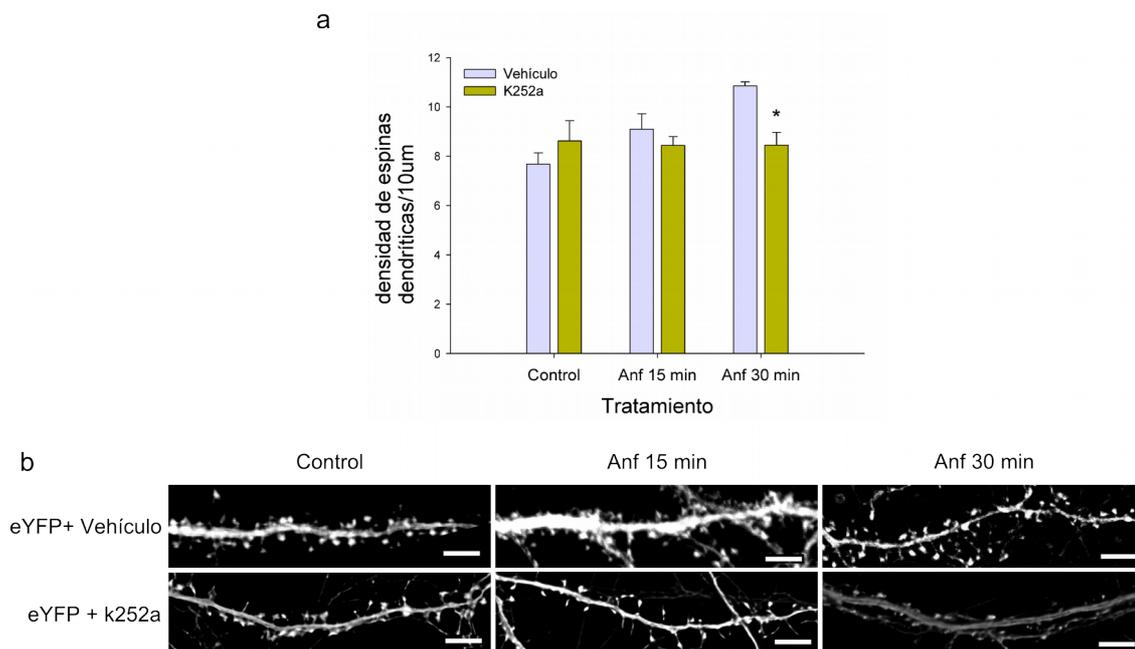


Figura 25. Participación de BDNF en la espinogénesis inducido por Anf. en cultivos de neuronas disociadas de hipocampo. (a) Densidad de espinas dendríticas cada 10µm de dendrita apical, bajo los distintos tratamientos. (b) Imágenes confocales representativas de fragmentos dendríticos de neuronas piramidales de CA1 provenientes de cultivos disociados de hipocampos bajo las diferentes condiciones experimentales, donde se observa que la inhibición de la señalización de BDNF, con el inhibidor farmacológico k252a, previene el efecto espinogénico inducido por el estimulante. Mag 63x y 2,3 zoom digital. Escala corresponde a 5µm. ANOVA de una vía, * $p < 0,05$, test a *posteriori* Duncan. eYFP+Veh 4 neuronas, eYFP+Anf 15min 3 neuronas, eYFP+Anf 30 min 2 neuronas, eYFP+k252 4 neuronas, Anf 15 min+k252a 3 neuronas, Anf 30min+k252a 4 neuronas.

4.5.2b Caracterización Morfológicas de las Espinas Dendríticas de Neuronas Provenientes de Cultivos Disociados de Hipocampo

En la figura 26a se observa que el tratamiento con 15 minutos de Anf provoca un incremento de las espinas dendríticas del tipo “stubby” con respecto a su control, mientras que la densidad de espinas de dicha morfología no aumentan a dichos tiempos en presencia de K252a. Sin embargo, a los 30 minutos de exposición al estimulante, esta tendencia se revierte (ANOVA de dos vías, efecto de la interacción tratamiento*inhibidor: $F(2, 14)=6,5183$, $p < 0,01$, test a *posteriori* Duncan).

Por otro lado, encontramos una tendencia a incrementar progresivamente el número de espinas dendríticas del tipo “mushroom” al tratar los cultivos con Anf. Mientras que en presencia de K252a este efecto parece estar atenuado (ANOVA de dos

vías, $F(2, 14)=2,9767$, $p>0,05$) (fig. 26b).

Finalmente el ANOVA reveló un efecto de la interacción entre tratamiento*inhibidor ($F(2,14)=6,8801$, $p<0,01$) y el test a *posteriori* Duncan indicó un aumento del número de espinas del tipo “thin” provenientes de cultivos tratados con K252a y sometidos a 15 min de Anf con respecto a su control, mientras que a los 30 min de tratamiento con Anf se observa que el inhibidor previene el aumento de espinas “thin” inducidas por la exposición de Anf 30min (fig. 26c).

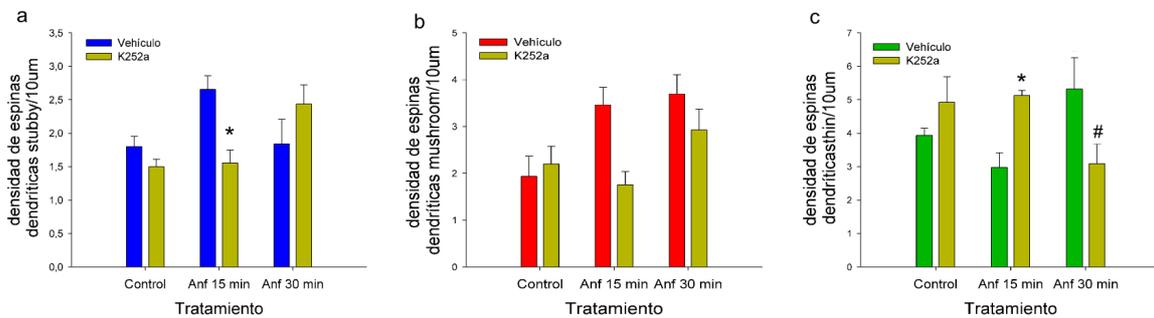


Figura 26. Análisis de la morfología de espinas dendríticas, de dendritas de neuronas piramidales provenientes de cultivos disociados de hipocampo bajo las diferentes condiciones experimentales: K252a o Vehículo y en presencia del estimulante (Anf) o ausencia del mismo (Vehículo). (a) Densidad de espinas del tipo “stubby”. (b) Densidad de espinas del tipo “mushroom”. (c) Densidad de espinas del tipo “thin”. Expresados cada 10µm de dendrita. ANOVA dedos vías, * $p<0,01$, # $p<0,05$, test a *posteriori* Duncan.

4.5.3 Análisis de la Expresión de Proteínas Relacionadas a la Plasticidad Sináptica, en Cultivos de Neuronas Disociadas de Hipocampo

Con el objeto de determinar si BDNF estaría participando de la generación de espinas dendríticas inducidas por Anf, cultivos primarios disociados de hipocampo fueron tratados por diferentes tiempos con Anf. Como control positivo (de generación de espinas) estimulamos con glicina bicuculina y posteriormente todos los cultivos fueron procesados para obtener muestras de fracciones sinaptosomales que luego fueron analizadas por Western blot. Debido a que la determinación de BDNF es complicada, normalmente se usa como medida indirecta de liberación de BDNF la relación de TrkB autofosforilado (activado, pTrkB) sobre TrkB total. Como se puede observar en la figura 27a encontramos

que no hay diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, se observa una tendencia a aumentar esta relación a partir de los 15 min de tratamiento con Anf, llegando a valores máximos a la hora de tratamiento y disminuyendo a las 48 horas. Por otro lado, se observa que a partir de los 30 minutos de exposición a Anf comienzan a incrementar los niveles de expresión del receptor TrkB total siendo máxima su expresión a las 48 horas (fig. 27b). Al analizar los niveles de expresión de TrkB Tr (TrkB truncado) encontramos que hay una tendencia a aumentar a las 48 horas de tratamiento con Anf (fig. 27c).

De manera interesante, en la figura 27d, observamos un incremento paulatino de los niveles de expresión de la proteína p35 luego del tratamiento con Anf llegando a valores máximos de expresión a las 48 horas de exposición al psicoestimulante. Finalmente observamos que los niveles de expresión de PSD95 aumentan aproximadamente un 30% con glicina con respecto al control, mientras que a la hora de tratamiento con Anf se observa una tendencia a aumentar, aproximadamente un 50%, la expresión de dicha proteína, el cual se mantiene por lo menos hasta las 48 horas (fig. 27e).

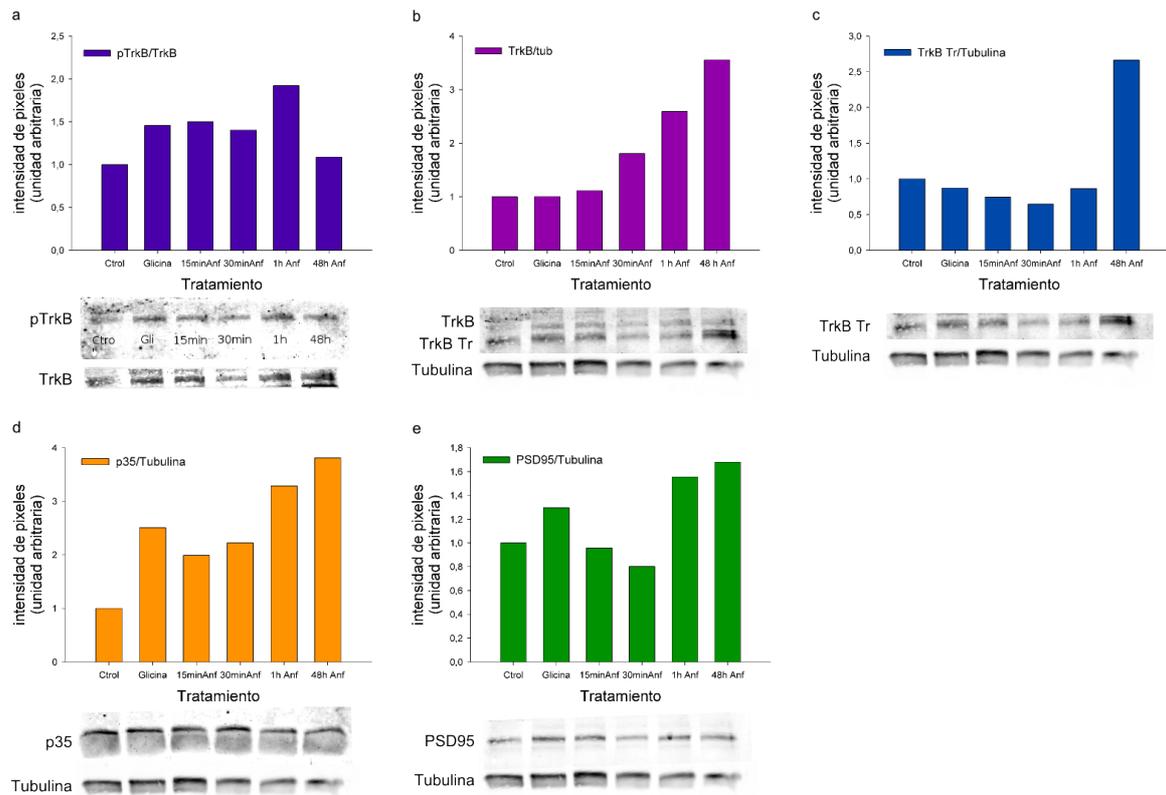


Figura 27. Niveles de expresión de pTrkB, TrkB total, TrkB Tr, p35 y PSD95 de cultivos disociados de hipocampo tratados a diferentes tiempos con Anf. (a) Análisis de Western blot mostrando niveles de expresión de pTrkB. A partir de los 15 min de tratamiento con Anf se observa un aumento de expresión, siendo máximo a la hora (b) Análisis de Western blot mostrando niveles de expresión de TrkB total, aumentando progresivamente a partir de los 30 minutos de exposición a Anf y llegando su máxima expresión a las 48h (c) Análisis de Western blot mostrando niveles de expresión de TrkB Tr, se observa un marcado aumento a las 48h. (d) Análisis de Western blot mostrando niveles de expresión de p35, aumenta paulatinamente junto al tiempo de exposición con la droga. (e) Análisis de Western blot mostrando niveles de expresión de PSD95, se observa un aumento a la hora y a las 48h.

4.5.4 Análisis de la Expresión de Proteínas Relacionadas a la Plasticidad Sináptica, en Ratones Administrados con un Protocolo de Dos Inyecciones.

Con el fin de evaluar si BDNF estaría participando de la generación de espinas dendríticas inducidas por Anf, como así también con el objeto de evaluar los niveles de expresión de otras proteínas de particular interés para este trabajo, ratones de entre 30 y 40 días fueron administrados con un PDI y posteriormente fueron sacrificados a dos tiempos post-última inyección: una hora y cuatro horas. Las muestras de hipocampo,

fueron procesadas para obtener fracciones sinaptosomales que luego fueron analizadas por Western blot.

En la figura 28a, se observa una tendencia a aumentar los niveles de expresión del receptor de BDNF fosforilado (pTrkB) luego de la hora post-inyección, aumentando un 50% más con respecto a su control Sal/Sal, a las 4h post-inyección con Anf; sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa. Este resultado estaría acorde a lo obtenido en cultivos de neurona disociados (fig 28a). Mientras que encontramos una tendencia a disminuir los niveles de expresión del receptor TrkB total y de su fragmento truncado luego de la administración con Anf, haciéndose más marcada aún a las 4 horas post-inyección (fig. 28 b y c). Por otra parte, encontramos una tendencia a aumentar tanto la expresión de Cdk5 como de p35 a la hora pos-última inyección, disminuyendo parcialmente a las 4 horas (fig. 28 d y e). Finalmente se observa una leve tendencia a aumentar los niveles de expresión de PSD95 luego de la 4 horas post-inyección con Anf, con respecto a los sujetos administrados con Sal (fig. 28f).

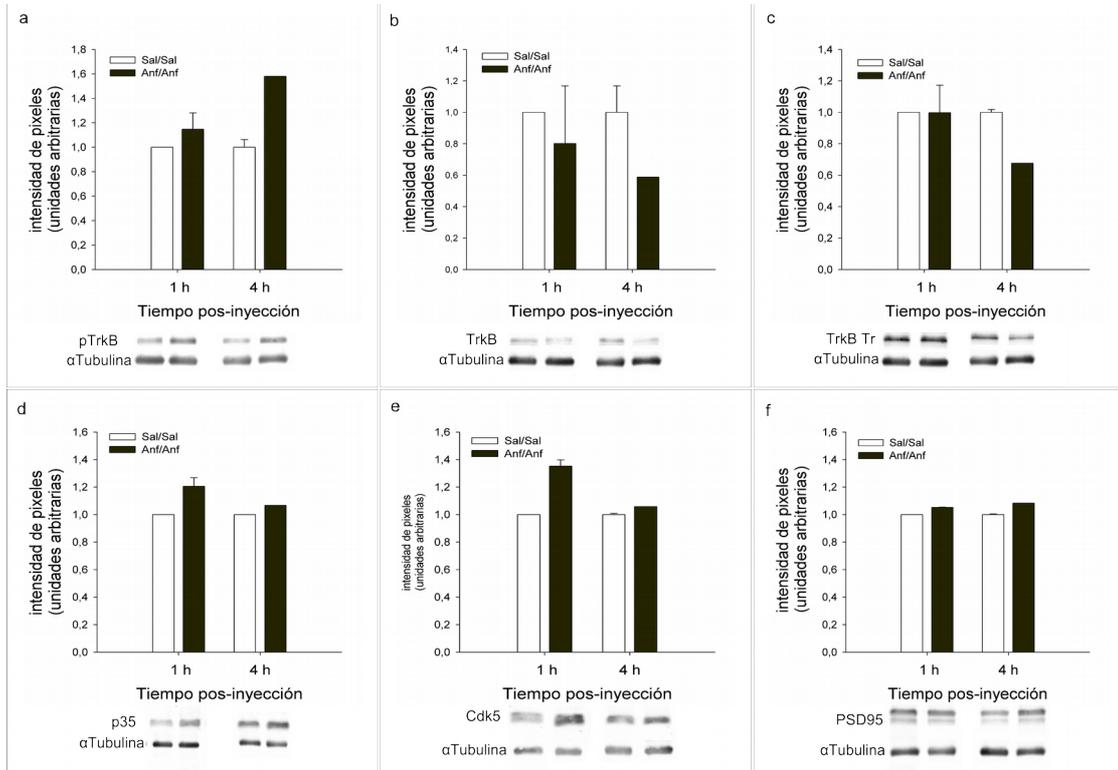


Figura 28. Niveles de expresión de pTrkB, TrkB, TrkB Tr, p35, Cdk5 y PSD95 en ratones administrados Sal/Sal o Anf/Anf y sacrificados a la hora o las 4 horas post-inyección. Análisis de Western blot provenientes de muestras de FS de hipocampo de: (a) niveles de expresión de pTrkB (b) niveles de expresión de TrkB total (c) niveles de expresión de TrkB Tr, (d) niveles de expresión de p35 (e) niveles de expresión de Cdk5 (f) niveles de expresión de PSD95. Sal/Sal 1 hora n=2, Sal/Sal 4 hora n=3, Anf/Anf 1 hora n=3, Anf/Anf 4 hora n=2

5

Discusión

El estudio de la plasticidad sináptica estructural inducida por psicoestimulantes, como cocaína y anfetamina, ha sido estudiada principalmente en regiones tales como el estriado y la corteza prefrontal, dejando de lado otras áreas límbicas asociadas a órdenes superiores del cerebro (Koob 1992; Spanagel y Weiss 1999; Steinkellner et al. 2014; Dumitriu et al. 2012; Kiraly et al. 2010; Deng et al. 2010). Asimismo, los experimentos realizados en los últimos 10 años han permitido determinar la existencia de un efecto espinogénico provocado por la acción de psicoestimulantes. Dichos estudios han sido enfocados principalmente a través de la utilización de animales enteros normales o transgénicos, sometidos al tratamiento de las drogas de abuso y sus cerebros procesados para diferentes técnicas, mayoritariamente impregnación de Golgi, que pudieran poner de manifiesto la presencia de espinas dendríticas (Norrholm et al. 2003; Kolb et al. 2003; Li et al. 2004; Lee et al. 2006; Allen et al. 2006). A pesar de los grandes avances realizados en esta materia en la última década poco se conoce hasta el momento acerca de los mecanismos que gobiernan dicho efecto.

En este trabajo de tesis demostramos que el tratamiento con Anf a animales juveniles, en un nuevo contexto, provoca la generación de espinas dendríticas en una región del cerebro que no es la habitualmente estudiada, como lo es el hipocampo. Asimismo, fuimos los primeros en replicar dicho efecto en cultivos de hipocampo en condiciones tanto “*in vitro*” como “*ex vivo*”. Por otra parte, hallamos que es necesaria la actividad de la quinasa Cdk5 para que dicho fenómeno se desarrolle, hallazgos similares han sido reportados en estriado y empleando cocaína de manera crónica, por Norrholm y

col., 2003. A su vez, encontramos evidencias que la quinasa desempeñaría su acción formando un complejo con su activador específico p25. Nuestros resultados sugieren que dicho complejo ejercería su acción mediante la modulación de la actividad de Pak, quinasa implicada en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, y de este modo mantendría las espinas inducidas por el estimulante. Finalmente, resultados preliminares sugieren que BDNF y su receptor TrkB, probablemente a través de su fosforilación por Cdk5, serían los responsables de generar las espinas dendríticas inducidas por Anf.

5.1 Morfogénesis de espinas dendríticas inducidas por anfetamina

5.1.1 *In vivo*

El hipocampo es un área de particular interés, ya que juega un papel importante en varios aspectos del proceso de adicción, incluyendo la recaída y el uso de drogas. El hipocampo participa en la mediación de las propiedades reforzantes agudas de las drogas y en la recaída del consumo de la misma, esto se refleja en una neuroplasticidad diferencial en regiones específicas luego de exposiciones repetidas o del uso de las mismas (Eisch y Harburg 2006; Wolf 1998; Berke y Hyman 2000; Kelley 2004). Las neuroadaptaciones tales como la generación de nuevas sinapsis, fortalecimiento o debilitamiento de sinapsis ya existentes, síntesis de proteínas, etc., inducidas por las drogas de abuso en el hipocampo son de una importancia particular, ya que dichas alteraciones en esta estructura repercuten en otras áreas cerebrales. Particularmente, el hipocampo, se encuentra ubicado anatómicamente del tal manera que puede influir sobre circuitos cerebrales relacionados a áreas de recompensa. Como ya se detalló en la introducción, el hipocampo recibe aferencias desde el NAc y ATV y envía aferencias al NAc (Kelley y Domesick 1982; Verney et al. 1985; Groenewegen et al. 1987; Milner y Bacon 1989; Totterdell y Smith n.d.; Gasbarri et al. 1991; Goldsmith y Joyce 1994; Floresco et al. 2001; Bannerman et al. 2004). Dado que estas alteraciones en el hipocampo tienen el

potencial de influenciar las vías de recompensa del cerebro, sería interesante considerar si también participan en formar las intensas memorias asociadas al uso de drogas y a la recaída (Eisch y Harburg 2006).

Por otra parte, dado que el contexto ambiental en el cual las drogas de abuso son administradas contribuye a la experiencia con la droga y es un estímulo poderoso y persistente para evocar memorias de esa experiencia aún en el adicto en abstinencia; y teniendo en cuenta que estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio, (Tesis doctoral de la Dra. Mlewski), demostraron que el ambiente en el cual Anf es administrada (en un contexto novedoso) utilizando un protocolo de dos inyecciones (PDI), es fundamental para que los individuos desarrollen sensibilización locomotora a los efectos estimulantes de la Anf en este trabajo administramos Anf, utilizando el mismo PDI, a ratones machos juveniles, en un ambiente novedoso y estudiamos la espinogénesis inducida por la droga en el hipocampo, región que también se encuentra implicada en la memoria espacial.

A pesar que numerosos estudios han encontrado alteraciones dramáticas en la densidad de espinas dendríticas inducidas por estimulantes en estriado y corteza prefrontal (Robinson y Kolb 1997; Robinson y Kolb 2004; Li et al. 2004) los estudios sobre el efecto que provocan los estimulantes en las dendritas de otras regiones del cerebro, como el hipocampo, son limitados (Boikess y Marshall 2008).

En los escasos estudios llevados a cabo en animales en los cuales se estudió la plasticidad sináptica estructural inducida por la administración de psicoestimulantes, en regiones no clásicas como el hipocampo, los esquemas de administración utilizados son tratamientos crónicos (Boikess y Marshall 2008; Rademacher et al. 2006; Shen et al. 2006; Ahn et al. 2013). Mientras que en el presente trabajo encontramos que la administración con Anf a ratones de entre 30-40 días de edad, con un esquema de administración de sólo dos inyecciones, PDI, en un contexto novedoso, provoca un aumento significativo en la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA1. Curiosamente, observamos que el mayor incremento de espinas dendríticas ocurre cuando los sujetos reciben Sal en la primera fase y Anf en la segunda fase (Sal/Anf), sugiriendo que la primera

inyección con Anf provocaría un dramático pero transitorio aumento en el número de espinas dendríticas (cuatro horas post-inyección), disminuyendo levemente tiempos mas tarde o con la segunda exposición a la droga, aunque siempre con niveles de espinas dendríticas mayores a los sujetos controles (fig 11).

Por otra parte, la mayoría de los estudios sobre plasticidad sináptica inducida por Anf en la región del hipocampo, sólo se limitan a cuantificar el número de las espinas dendríticas (Crombag et al. 2005) o a caracterizar niveles de expresión de proteínas, ya sea por inmunohistoquímica o por Western blot, que podrían estar relacionadas con la plasticidad sináptica inducida por la droga. Rademacher y colaboradores (2006), observan que en animales condicionados a la preferencia de un lugar por la administración de Anf, hay un aumento en la densidad de células inmuno-reactivas para C-Fos y sinaptofisina. Por otra parte Boikess y Marshall (2008), demuestran que la administración crónica con Anf, provoca un aumento de espinofilina, proteína de unión a F-actina y a proteína fosfatasa 1, usada como indicador de alteraciones en la morfología dendrítica (Boikess y Marshall, 2008). En este trabajo de tesis aportamos nuevas evidencias que amplían el conocimiento de la plasticidad sináptica estructural inducida por Anf, gracias al análisis de la morfología de las espinas dendríticas. Específicamente encontramos que la administración de 4mg/kg de Anf en un esquema de PDI, provoca un incremento significativo de las espinas dendríticas del tipo “stubby” (fig. 12). Como se detalló en la introducción, este tipo de espinas son las más abundantes durante el desarrollo y son consideradas estructuras muy plásticas, que están fuertemente acopladas al eje dendrítico (Schmidt y Eilers 2009). Este fuerte contacto a la dendrita, sugiere que los cambios en la frecuencia de espinas “stubby” pueden impactar desproporcionadamente en la excitabilidad neuronal en comparación a otros tipos de espinas (Noguchi y *col.*, 2005).

5.1.2 “Ex vivo” e “In vitro”

Como ya se mencionó anteriormente, varios estudios han reportado un aumento en la densidad de espinas dendríticas bajo condiciones estimulantes en diversas áreas del

cerebro, sin embargo, nuestros resultados son novedosos en cuanto a la estructura abordada y a las condiciones, cultivo organotípico de hipocampo, ya que no existen registros de explantos de hipocampo mantenidos *in vitro* y tratados con d-Anfetamina. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con Anf, tanto con una dosis de 50 μM como de 100 μM durante 48 horas, provoca un significativo aumento de la densidad de espinas en CA1 y CA3 (fig. 14). A su vez hallamos que en la región de CA1, el tratamiento de los cultivos organotípicos con 50 μM de Anf, provoca una tendencia a aumentar el número de espinas dendríticas del tipo “stubby” y “thin”, mientras que encontramos un aumento significativo en la densidad de espinas dendríticas del tipo “mushroom” con las dos dosis de Anf empleadas (fig. 15). Este incremento de espinas “mushroom” sugiere que el tratamiento con Anf estaría induciendo la génesis de espinas más grandes, que tienen una mayor capacidad para albergar PSD más grandes, mayor cantidad de receptores glutamatérgicos, REL, y por lo tanto funcionalmente más activas y fuertes en su respuesta a glutamato (Bourne y Harris, 2007). En la región de CA3 observamos un aumento significativo del número de espinas dendríticas del tipo “stubby” con ambas dosis de Anf, asimismo encontramos una tendencia a aumentar el número de espinas del tipo “mushroom” tanto con Anf 50 como 100 μM y solo una tendencia a aumentar el número de espinas “thin” al exponer los cultivos con la dosis más baja de Anf ensayada (fig. 15).

A partir de los resultados expuestos anteriormente, en los que observamos que ambas dosis de Anf fueron exitosas en inducir la morfogénesis de espinas dendríticas en las dos regiones del hipocampo abordadas, decidimos utilizar para el resto de los experimentos realizados *in vitro*, la dosis más baja de Anf y solo enfocar nuestra atención a la región de CA1.

Acorde con los resultados discutidos hasta el momento encontramos que el tratamiento durante 48 horas con Anf en cultivos disociados de neuronas de hipocampo (condiciones “*in vitro*”) provoca también un aumento significativo de espinas dendríticas con respecto a su control (fig. 16).

El conjunto de las evidencias discutidas hasta el momento, en las que hallamos que Anf promueve la morfogénesis de espinas dendríticas en los tres sistemas estudiados:

condiciones “*in vivo*”, “*ex vivo*” e “*in vitro*”, le otorga gran solidez a estos resultados.

Por otro lado, el haber obtenido estos resultados en condiciones tanto *in vitro* como *ex vivo*, también nos generaron otras incógnitas. Como fue señalado en la introducción, Anf es sustrato del DAT ingresando de esta manera al interior de la neurona dopaminérgica y provocando el vaciado de las vesículas conteniendo DA al citoplasma, posteriormente ésta DA es liberada al espacio peri-sináptico a través del transporte reverso por el DAT. En los cultivos organotípicos, las largas aferencias axonales y las fibras eferentes son cortadas durante la disección y los segmentos distales degeneran durante los primeros días *in vitro* (Banker y Goslin, 1998). Si tenemos esto en cuenta, Anf carecería de su sustrato tradicional para ejercer su acción en los cultivos organotípicos de hipocampo, si es que al momento del tratamiento con Anf (8-9 DIV), las terminales dopaminérgicas ya hubiesen degenerado. Asimismo la señalización dopaminérgica es importante en el proceso de adicción a drogas. En un estudio llevado a cabo por Gao y colaboradores en el 2006 (Gao y col., 2006), observan que la estimulación de receptores D1, con un agonista dopaminérgico, influencia la plasticidad sináptica en neuronas disociadas de hipocampo mantenidas *in vitro*, modulando el tráfico de receptores AMPA. Como es sabido en neuronas de CA1, la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés), supone la inserción de receptores AMPA en las sinapsis excitatorias. Específicamente, en dicho trabajo encuentran que cinco minutos de exposición con el agonista de D1, aumenta la expresión en superficie de una subunidad del receptor glutamatérgico AMPA (GluR1), aumentando su tasa de externalización, en un principio a sitios extrasinápticos a través de PKA y luego CaMKII promueve su redistribución a sitios sinápticos. De este modo, mediante el incremento de la inserción del “*pool*” extrasináptico los receptores D1 promueven el LTP. En este sentido, teniendo en cuenta que Anf provoca un aumento en la liberación de glutamato (Kim et al. 1981) y que dicha droga, a través de la señalización dopaminérgica facilitarían el LTP (Fao, Sun y Wolf, 2006), los psicoestimulantes podrían usurpar este mecanismo provocando una plasticidad inapropiada que contribuye a las conductas relacionadas a la adicción.

Curiosamente, los análisis por Western blot realizados a partir de muestras de

cultivos organotípicos de hipocampo tratados con Anf durante 48 horas, demostraron un marcado aumento en los niveles de expresión del DAT (fig. 17c), sugiriendo en primer lugar, que en dicho sistema y bajo nuestras condiciones experimentales está presente la maquinaria necesaria para que la droga pueda ejercer su efecto y en segundo lugar que Anf podría estar induciendo el aumento de los niveles de expresión del DAT probablemente para que haya más transportador disponible para recaptar el exceso de DA liberada a causa de la droga. Sin embargo, con estos resultados no podemos asegurar que este aumento del DAT sea funcional y que se encuentre inserto en la membrana pre-sináptica para poder realizar dicha recaptación. Experimentos de biotilación podrían llegar a brindarnos algo de claridad en este aspecto.

Estos resultados estarían de acuerdo con un estudio en el que observan un aumento significativo en los niveles del ARN mensajero del DAT luego del tratamiento crónico con Anf (Shilling et al. 1997). Sin embargo, en estudios llevados a cabo *in vitro* encontraron que el tratamiento con Anf a células embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293) provoca una disminución del DAT en membrana (Saunders et al. 2000; Zahniser y Sorkin 2009) mientras que el tratamiento por tiempos muy cortos con Anf (30 segundos a un minuto) promueve el efecto contrario (Johnson et al. 2005; Kahlig y Galli 2003; Furman et al. 2009; Richards y Zahniser 2009). Estos resultados podrían ser explicados si se tiene en cuenta que inmediatamente después de la liberación de DA (provocada, en este caso por la droga), sería necesaria una mayor capacidad de recaptación de DA por lo que se favorecería la inserción de DAT en la membrana (Furman y col., 2009). Por otro lado, la disminución de DAT luego de periodos prolongados de altas concentraciones de DA podría representar un mecanismo de protección, dado que la DA citosólica puede ser tóxica para las neuronas (Ziv y col., 1994).

Por otra parte, existen trabajos que reportan que en hipocampo los niveles de expresión de DAT son bajos, motivo por el cual la recaptación de dopamina se complementa con el transportador de serotonina (SERT) (Borgkvist et al. 2012). Este no sería el caso de nuestro trabajo ya que hallamos que el tratamiento con Anf incrementa drásticamente los niveles de expresión del DAT. Asimismo, también existe evidencia de la

presencia de un transportador de monoaminas "PMAT" que se encuentra ampliamente distribuido y expresado en el cerebro de los mamíferos. La especificidad de dicho transportador por las aminos biógenas y su amplia expresión en el SNC indicaría un rol homeostático, de este transportador, resguardando niveles basales bajos, de monoaminas (extracelulares) en el cerebro. Y en aquellas áreas que reciben inervaciones monoaminérgicas pero que carecen de transportadores de alta afinidad, PMAT podría adquirir un rol activo en la finalización de la neurotransmisión monoaminérgica (Dahlin et al. 2007). Sin embargo todavía no ha sido demostrado si los psicoestimulantes sirven de sustrato para dicho transportador.

Intrigados por como Anf actúa en nuestro sistema de estudio, quisimos indagar un poco más en este sentido evaluando los niveles de DA y glutamato (como así también de sus metabolitos) a través de HPLC, pero lamentablemente tuvimos dificultades técnicas para poder determinar los niveles de dichos neurotransmisores.

Otra proteína de interés para nuestro estudio, relacionada a la plasticidad sináptica y que nos estaría indicando sinapsis funcionales, es la PSD-95. Sin embargo, los cultivos organotípicos de hipocampo tratados con Anf no mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión de PSD-95 revelados mediante Western blot, probablemente por tratarse de muestras de homogenato total y no de fracciones sinaptosomales, en las cuales si se podría observar un enriquecimiento de esta proteína (fig. 17D).

5.2. Participación de Cdk5 y sus activadores específicos, p35 y p25, en la espinogénesis inducida por anfetamina

Un estudio llevado a cabo por el laboratorio del Dr Greengard (Norrholm y col., 2003) demuestra que infusiones intra-craneales en NAc con un inhibidor farmacológico de Cdk5, roscovitine, atenúa el aumento de espinas dendríticas inducida por el tratamiento crónico con cocaína, en dicha región. A su vez, numerosos trabajos reportan un incremento tanto de la expresión como de la actividad de Cdk5 y de sus activadores específicos, p35 y p25, luego del tratamiento con psicoestimulantes (Mlewski y col., 2008,

Bibb y col., 2001; Ehrlich y col., 2002). A partir de estas evidencias y teniendo en cuenta que nuestros resultados muestran un efecto espinogénico inducido por Anf, estudiamos la participación de Cdk5 y sus activadores específicos en dicho fenómeno. En primer lugar, al determinar los niveles de expresión de la quinasa Cdk5 y su activador específico p35, en cultivos organotípicos de hipocampo bajo condiciones estimulantes y vehículo, hallamos que los niveles de Cdk5 no varían significativamente en ambas condiciones (fig 17b). Sin embargo, cuando los cultivos fueron expuestos a Anf, los niveles de expresión de p35 incrementaron significativamente con respecto a los controles (fig 17a). Este resultado es de interés, ya que dicho activador es el factor limitante de la actividad de la quinasa Cdk5 (Takahashi et al. 2005). Lamentablemente, no nos fue posible determinar los niveles de expresión de p25 ya que no existe un anticuerpo comercial que reconozca únicamente al fragmento truncado de p35, y el anticuerpo comercialmente disponible para p35, no logró resolver los niveles de p25.

Estos hallazgos nos motivaron a investigar si Cdk5 estaría participando de la espinogénesis inducida por el psicoestimulante. De modo interesante, encontramos que tanto la inhibición de la actividad como la expresión de Cdk5, previno el incremento en la densidad de espinas dendríticas inducida por Anf (fig. 18). Específicamente, observamos que la inhibición de Cdk5, con cualquiera de las tres estrategias utilizadas: sobre-expresión de un plásmido que codifica para DN-Cdk5, inhibición farmacológica de Cdk5 con roscovitine y sobre-expresión de un plásmido que codifica para un siCdk5, en condiciones fisiológicas no afecta la densidad de espinas dendríticas, ya que la densidad de las espinas permanecieron en valores similares al control (fig. 18), mientras que en condiciones estimulantes, la inhibición de Cdk5 previno la espinogénesis inducida por Anf. Estos resultados sugieren que la participación de Cdk5 en la morfogénesis de espinas dendríticas, es dependiente de Anf ya que su inhibición en condiciones basales no provoca efecto sobre la densidad de espinas al menos en nuestras condiciones experimentales. Por otro lado y mas importante aún, estos resultados nos demuestran que para que Anf promueva la morfogénesis de espinas dendríticas es necesario que la actividad de la quinasa Cdk5 este intacta.

Como ya se mencionó anteriormente, Norrholm y *col.*, (2003), obtuvieron resultados similares a los nuestros en relación a la quinasa Cdk5. En su trabajo observaron que la administración crónica con cocaína provoca un incremento en la densidad de espinas dendríticas en neuronas de NAc y al inhibir, intra-cranealmente con roscovitine en esa región, encuentran que dicho efecto es prevenido. Existen además numerosos trabajos en los que demuestran que Cdk5 interviene en la plasticidad sináptica. Por ejemplo, ha sido observado que la administración repetida con cocaína provoca un aumento de la actividad de Cdk5, que induce la fosforilación del factor de transcripción MEF2, reduciendo de este modo su actividad, y en consecuencia aumenta la génesis de espinas dendríticas. Mientras que la expresión de un constructo constitutivo activo de MEF2 en NAc impide el incremento en la densidad de espinas en respuesta a la administración crónica con cocaína e inesperadamente aumenta la sensibilización comportamental a cocaína (Pulipparacharuvil et al. 2008). Asimismo ha sido reportado que la expresión transitoria de p25, en un modelo de ratón inducible para p25, provoca un aumento de la actividad de Cdk5 y promueve la generación de espinas dendríticas (Fischer y *col.*, 2005). Otro estudio en el que también se involucra a Cdk5 con la plasticidad sináptica, demuestra que la proteína de unión a la tubulina mediadora de respuesta de colapso proteína 1 (CRMP1) puede ser fosforilada por Cdk5 en la treonina 509 y serina 522, y que dicha fosforilación es crucial para la generación de espinas dendríticas en respuesta a semaforina 3A (Yamashita y *col.*, 2007).

En un trabajo del grupo de Ip (Lai y *col.*, 2012) observan que es necesario que Cdk5 fosforile el receptor TrkB, luego de ser activado por BDNF, para que dicha neurotrofina promueva la generación y maduración de espinas dendríticas. Por otra parte, Cdk5 también ha sido identificada como un regulador de los receptores de NMDA, particularmente de la subunidad NR2A. La fosforilación de NR2A por Cdk5 en la serina 1232 afecta la actividad del receptor, incrementándola. Dicho efecto fue inhibido por roscovitine, inhibidor de la actividad de Cdk5. Lo que indicaría que los cambios en la actividad del receptor de NMDA en neuronas son causados, al menos en parte, por la fosforilación de la subunidad NR2A por Cdk5, provocando un incremento de la actividad

de los receptores (Li y *col.*, 2001). Esto concuerda con otros trabajos que exponen que la inducción del LTP es acompañado de la fosforilación de subunidades del receptor NMDA (Sakimura et al. 1995).

Otra forma en la cual Cdk5 puede promover la sinaptogénesis es a través de la regulación de la proteína CASK (proteína periférica de la membrana plasmática), miembro de la familia MAGUK (proteína asociada a membrana guanilato quinasa), quien es reclutada a las terminales en desarrollo por SynCAM (molécula de adhesión celular 1) y Neurexinas/Neuroliginas. Cdk5 fosforila y regula la distribución de CASK a la membrana. En ausencia de Cdk5, CASK no es fosforilada y no es reclutada a las sinapsis en desarrollo y por lo tanto no interactúa con componentes esenciales presinápticos. Dentro de las consecuencias funcionales se encuentran alteraciones en el flujo de calcio (Samuels et al. 2007). A pesar de las evidencias citadas anteriormente, existe bibliografía en la que se involucra de manera negativa a la quinasa Cdk5 en relación a la sinaptogénesis. Por ejemplo, Ephexin1, GEF de Rho, es fosforilado por Cdk5 evento crítico en la retracción de espinas dendríticas en respuesta a ephrinA1, ligando afín que activa el receptor tirosina quinasa EphA4 (receptor efrina 4 tipoA) (Fu y Ip 2007). El receptor EphA4 activado recluta a Cdk5, quien luego fosforila a ephexin1 y activa de este modo a RhoA promoviendo la retracción de espinas dendríticas en respuesta a la estimulación por ephrinA1 (Fu y Ip, 2007). De manera notable, ha sido demostrado que EphA4 es necesario para la plasticidad sináptica en amígdala (Dodt et al. 2008), aumentando la posibilidad de que la vía de señalización EphA4-Cdk5-ephexin1 sea crucial para la regulación de la densidad de espinas dendríticas durante la plasticidad sináptica. Otro potencial candidato que mediaría la plasticidad de espinas dendríticas en respuesta a la actividad sináptica es la proteína Wiskott–Aldrich syndrome (WASP) de la familia de proteínas verprolina homóloga 1 (WAVE). WAVE1 es importante para la formación de espinas dendríticas en el estriado (Kim et al. 2006). WAVE1 regula la polimerización de actina y por lo tanto la formación de espinas dendríticas a través de la interacción con el complejo Arp2/3, y esa interacción es suprimida luego de la fosforilación de Cdk5 (Y. Kim y *col.*, 2006). Asimismo, la depolarización repetida de neuronas hipocámpales induce la desfosforilación de WAVE1

en los 3 sitios fosforilados por Cdk5 (Sung et al. 2008). Con todas estas consideraciones, podemos concluir que Cdk5 cumple un importante papel en la regulación de la plasticidad sináptica, y dependiendo de que fenómeno desencadene dicha plasticidad, Cdk5 promoverá ó inhibirá la generación de espinas dendríticas.

Por otra parte nuestros resultados demuestran que al analizar el efecto que provocó la inhibición de la actividad quinasa Cdk5 sobre la morfología de las espinas dendríticas, observamos que tanto roscovitine como la sobre-expresión de DN-Cdk5 previenen la tendencia a incrementar las espinas del tipo “stubby” inducidas por Anf (fig. 19a). Mientras que las tres metodologías empleadas atenúan significativamente el aumento de espinas del tipo “mushroom” inducido por Anf, **sugiriendo que Cdk5 estaría participando en el mantenimiento o generación de este tipo de espinas en particular** (fig. 19b). Finalmente la inhibición de Cdk5 no produjo ninguna diferencia en la densidad de espinas dendríticas del tipo “thin” (fig. 19c).

En base a los últimos resultados discutidos, los cuales demostraron que la actividad de Cdk5 es imprescindible para que se desarrolle el efecto espinogénico inducido por Anf, nos preguntamos si alguno de los activadores de Cdk5, ya sea p35 o su fragmento truncado p25, estaban involucrados en dicho fenómeno. Curiosamente, la sobre-expresión de los activadores de Cdk5 (p35 y p25) provocó efectos opuestos en relación a la espinogénesis inducida por Anf. En este sentido, tanto la sola exposición a Anf (cuando solo se sobre-expresa el plásmido eYFP) como la sobre-expresión del plásmido que codifica para el activador p25 en cultivos organotípicos de hipocampo bajo condiciones estimulantes, provocan un aumento de la densidad de espinas dendríticas (fig. 20). Estos resultados sugieren que el complejo Cdk5/p25 sería el responsable de modular el efecto espinogénico inducido por Anf. Estos hallazgos concuerdan con los estudios realizados por Fisher y colaboradores (Fisher y *col.*, 2005), los cuales demuestran que la expresión transitoria de p25, en un modelo de ratón inducible, provoca no solo el aumento de espinas dendríticas, sino que también facilita la memoria dependiente de hipocampo y aumenta la potenciación a largo plazo (del inglés LTP). Por el contrario, cuando se sobre-expresó el activador p35, observamos que éste se comporta como un

inhibidor del efecto espinogénico inducido por Anf, ya que previene el aumento de espinas dendríticas inducidas por el psicoestimulante (fig. 20). Estudios recientes, han demostrado que la fosforilación de p35, mediante el complejo Cdk5/p35, promueve su homodimerización e induce la unión de haces de actina filamentosa (F-actina), estabilizando así la F-actina (He y col., 2010; Xu y col., 2011) lo cual podría estar impidiendo de esta manera, la morfogénesis de nuevas espinas. A su vez, la dimerización y asociación de p35 con F-actina ocurre en la región N-terminal, la cual se encuentra ausente en el producto clivado de p35, p25. Es decir que el exceso de p35, cuando ésta es sobre-expresada, por un lado competiría con p25 (endógeno) por la unión a Cdk5 (evitando la formación del complejo Cdk5/p25, el cual permitiría la morfogénesis de espinas inducida por Anf) y además estaría promoviendo la estabilización del citoesqueleto de actina. Sin embargo, el mecanismo por el cual p35 previene el aumento de espinas dendríticas inducidas por Anf queda aún por dilucidar.

Los análisis por Western blot de los cultivos organotípicos tratados con Anf, del presente trabajo de tesis, mostraron un aumento de los niveles de expresión de p35 en relación a su control. Condición imprescindible para la generación de p25, debido a que éste es el fragmento proteolítico de p35 (Takahashi y col., 2005; Shah y col., 2014). Por otra parte, sería razonable pensar que al sobre-expresar el activador p35 habría tal exceso de dicha proteína, que la enzima calpaína la que sería el factor limitante, responsable de catalizar el clivaje de p35 en p25, no daría abasto para clivar dicho exceso.

La generación de p25, a partir de p35, ha sido clásicamente y casi exclusivamente relacionada con la neurodegeneración como así también ha sido implicada en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer. Sin embargo, la habilidad de p25 de incrementar la plasticidad sináptica y la memoria lleva a cuestionarnos si p25 es generado de manera "fisiológica" para servir a este propósito (Greengard et al. 1999; Cruz et al. 2003). Otros autores, como Angelo y colaboradores, proponen que la generación fisiológica de p25 es para facilitar la plasticidad y la cognición (Angelo et al. 2006). Tal afirmación concuerda con la observación de que calpaína podría estar involucrada en el LTP; la formación de p25 podría ser un mecanismo mediante el cual la calpaína afectaría el

LTP. La aparente ausencia de p25 en situaciones fisiológicas, junto a la capacidad, de la misma para aumentar la plasticidad y memoria, podría significar que solo es generada durante eventos particulares como la actividad sináptica relacionada al aprendizaje. Alternativamente, podría ser generada en muy bajos niveles o en compartimentos discretos que imposibilitarían su detección de rutina. Estos autores también han propuesto una hipótesis en la cual le otorgan un rol “compensatorio” a p25 en algunos desórdenes neurodegenerativos (Angelo y col., 2003). Su hipótesis predice que p25 se forma para mejorar los déficits tempranos de plasticidad y las alteraciones de la memoria asociativa; por ejemplo en los albores de la enfermedad de Alzheimer. Al acumularse, p25 puede eventualmente promover cambios moleculares que contribuyen a la disfunción sináptica, neurodegeneración y en última instancia contribuyen también a los déficits de memoria. Esta respuesta compensatoria es más plausible si depende de la regulación positiva de un mecanismo fisiológico existente más que a la evocación de una respuesta reservada exclusivamente para un proceso patológico a la que sólo la minoría de la población podría sucumbir (Angelo, Plattner, y Giese, 2006). La hipótesis de que la generación de “x” compensatoria recapitula la formación de “x” fisiológica, ha sido observada en otros fenómenos, por ejemplo se ha visto que pacientes con deterioro cognitivo leve presentan respuestas compensatorias que implican la regulación del sistema colinérgico (DeKosky 2002). Debido que la habilidad de generar p25 se encuentra evolutivamente conservada (Angelo, Plattner, y Giese, 2006), es también razonable asumir que la formación de p25 ocurre por otras razones más allá de solo promover la neurodegeneración. Nuestros resultados apoyarían dicha hipótesis, en donde la generación de p25, por la acción de Anf; asumiendo que este psicoestimulante promueve la liberación de glutamato y por ende aumenta la liberación de calcio y la activación de calpaína con la consiguiente formación de p25; estaría usurpando los mecanismos subyacentes a la plasticidad sináptica de eventos fisiológicos modulados por p25.

El análisis de la morfología de las espinas dendríticas cuando los activadores de Cdk5 son sobre-expresados, mostraron la sobre-expresión de p25 bajo condiciones basales provoca un incremento significativo en la densidad de espinas dendríticas del tipo

“thin” con respecto al control, aumentando aún más bajo condiciones estimulantes con respecto a su control (fig 21c). Por otra parte, la densidad de espinas dendríticas del tipo “thin” no varió al sobre-expresar p35. A su vez, tanto la sobre-expresión de p35 como p25 previene la formación de espinas dendríticas del tipo “stubby” inducidas por Anf (fig. 21a). Con respecto a la morfología de espinas “mushroom”, observamos que la sobre-expresión de p35 en condiciones estimulantes actuaría de manera similar que la inhibición de Cdk5, es decir previene la generación de dichas espinas, mientras que al sobre-expresar p25, bajo condiciones estimulantes, observamos un leve aumento con respecto a la sobre-expresión de dicho plásmido en condiciones basales. Sin embargo, éste incremento no llega a los valores de la sobre-expresión de sólo eYFP bajo condiciones estimulantes (cabe destacar, como ya se mencionó anteriormente que la sobre-expresión de eYFP se hace sólo para poder visualizar las espinas dendríticas) (fig. 21b). Las espinas dendríticas son estructuras altamente dinámicas y para aumentar su volumen y de este modo cambiar su morfología a espinas “más maduras” (como lo son las “stubby” y “mushroom”) requieren de eventos celulares como: la dinámica del citoesqueleto actina, adición de membrana, aumento del PSD, etc, es decir una completa reorganización de la estructura de la espina (Murakoshi y Yasuda 2012). Los cambios en el citoesqueleto de actina son muy rápidos, se dan en el orden de los minutos y probablemente nuestro diseño experimental no es lo suficientemente plástico para detectar estos eventos dinámicos y por ello no observemos el aumento de espinas dendríticas del tipo “stubby” inducidas por Anf, cuando p25 es sobre-expresado, debido a la sobre-expresión por un largo período ininterrumpido.

5.3 Participación de Pak como efector de Cdk5 en la espinogénesis inducida por anfetamina.

Como ya se desarrollo anteriormente las espinas dendríticas son pequeñas protrusiones de la dendrita ricas en actina, altamente dinámicas y requieren para tal efecto un alto recambio del estado de los filamentos de actina (Fischer et al. 1998)

(Lendvai et al. 2000). La plasticidad de las espinas, es coordinada principalmente por la familia de las pequeñas RhoGTPasas (Rho, Rac y Cdc42), encargadas de regular el citoesqueleto de actina (Raftopoulou y Hall 2004). Las RhoGTPasas ciclan entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP (Nobes y Hall 1994), en este ciclado reside, en última instancia la plasticidad estructural.

La pequeña RhoGTPasa Rac y su efector Pak quinasa, han sido clásicamente involucradas en la formación de espinas dendríticas (Boda et al. 2008; Chen et al. 2010; Fiuza et al. 2013; Impey et al. 2010; Zhang et al. 2005; Hering y Sheng 2001), donde un aumento de la señalización vía Rac, activa a la quinasa Pak (sustrato de Cdk5), esta fosforila a LimK la que finalmente fosforila y provoca una disminución de la actividad de cofilina (p-cofilina), estabilizando los filamentos de actina. Sin embargo, en un estudio reciente en el cual se administra animales de manera crónica con cocaína, observan un aumento de espinas dendríticas (particularmente espinas del tipo “thin”) y demuestran que es necesario una disminución transitoria en la señalización de Rac1 para que se produzca dicho fenómeno (Dietz et al. 2012). Esta disminución transitoria de la señalización de Rac1, aumenta el recambio (ciclado) de actina, y es evidenciado por la disminución de la forma inactiva de cofilina (p-cofilina), lo que conlleva a mas cofilina activa y mayor número de espinas del tipo “thin” (Dietz y col., 2012). Estas evidencias estarían de acuerdo con otros estudios en los que demuestran la importancia de la vía de cofilina y de la dinámica de actina sobre la plasticidad estructural inducida por cocaína, aunque los detalles precisos de como cocaína regula la fosforilación de cofilina son más complicados (Toda et al. 2006; Shen et al. 2009; Toda et al. 2010). Ya que en un estudio, por ejemplo, reportan que no habría cambios en los niveles de p-cofilina pero si un incremento en los niveles totales de cofilina en respuesta a un desafío con cocaína luego de la abstinencia de la droga durante un tratamiento crónico (Shen y col., 2009), esto difiere de lo reportado por Dietz y colaboradores, quienes encuentran una disminución transitoria en los niveles de p-cofilina y no observan ningún cambio en los niveles de cofilina total en respuesta al desafío con cocaína. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, estarían de acuerdo con este último estudio (Dietz y col.,

2012), específicamente proponemos que el complejo Cdk5/p25 fosforilaría a Pak (p-Pak-treonina 212 -sitio consenso demostrado para Cdk5-)(Nikolic et al. 1998), disminuyendo parcialmente su actividad, lo que llevaría finalmente a una disminución de p-cofilina, aumentando el recambio/dinámica de los filamentos de actina necesario para la morfogénesis de espinas inducidas por Anf.

A favor de esta idea, nuestros resultados demuestran que al sobre-expresar un plásmido que codifica para una mutante defectiva de Pak, Pak-KD en la cual su actividad quinasa se encuentra inhibida (simulando la situación cuando la fosforilación es mediada por Cdk5) en cultivos organotípicos de hipocampo bajo condiciones estimulantes la densidad de espinas dendríticas aumenta a los mismos niveles que la sobre-expresión de eYFP (utilizado para visualizar las espinas) (fig. 22) en dichas condiciones, mientras que la sobre-expresión de una mutante constitutiva activa de Pak, Pak-CA (simulando la situación cuando la actividad de Cdk5 se encuentra inhibida) previene el efecto espinogénico inducido por la Anf (fig. 22). Estos resultados son coherentes con las evidencias obtenidas hasta el momento, ya que al sobre-expresar la mutante Pak-CA emulamos el efecto de la inhibición de Cdk5, en donde la falta de actividad de Cdk5 no podría fosforilar a Pak, por lo tanto ésta se encontraría activa y conduciría finalmente a una estabilización del citoesqueleto de actina (aumentando p-cofilina). Mientras que la sobre-expresión de la mutante Pak-KD simularía una actividad aumentada de Cdk5 (condición que se da bajo el tratamiento con el psicoestimulante, (Mlewski, Krapacher, Ferreras, y Paglini, 2008) y este incremento de la actividad estaría dirigido a fosforilar entre otros substratos a Pak, inhibiéndola y provocando un aumento del recambio de los filamentos de actina. Sin embargo, bajo condiciones basales la sobre-expresión de Pak-KD no fue capaz de incrementar la densidad de espinas dendríticas. Sugiriendo de este modo, que la fosforilación de Pak (pPak-tr212) mediada por Cdk5, no sería la responsable de generar las espinas dendríticas inducidas por el estimulante, sino que podría estar interviniendo en el **mantenimiento de las espinas generadas por el psicoestimulante**, apoyando los resultados discutidos en el punto anterior.

Como ya se mencionó, varios estudios sugieren que la actividad de Rac1 promueve

el desarrollo de espinas, mientras que la inhibición de Pak1 reduce el número de espinas en otros sistemas neuronales (Hering y Sheng 2001). Sin embargo el rol de Rac1 en la regulación de la dinámica de actina y en la morfología de las espinas es mucho más complicado y depende de muchos factores, como la edad, el tipo neuronal y puede llegar a variar hasta entre sistemas *in vitro* e *in vivo* (Tashiro et al. 2000; Tashiro y Yuste 2004). Por otra parte, ha sido demostrado que la actividad de cofilina incrementa la depolimerización de actina, nucleación y ramificación, lo que conduciría en última instancia, a espinas más delgadas y a nuevas protrusiones (Ghosh et al. 2004). Sin embargo, cabe destacar que los cambios en Rac1 y en la actividad de cofilina podrían no ocurrir exclusivamente en la espina sino que a lo largo de toda la neurona, incluyendo el soma, donde ha sido demostrado que Rac1 regula la transcripción de genes (Bosco et al. 2009).

Por otra parte, existen discrepancias en la bibliografía con respecto a la función de otras RhoGTPasas, tal como Rho A. Por un lado su actividad ha sido fuertemente vinculada a la retracción de espinas dendríticas o a la inhibición de la generación de las mismas. Sin embargo, también ha sido involucrado en la maduración de espinas a través de un aumento de la actividad de RhoA (Ryan et al. 2005). Sugiriendo que RhoA no solo actúa como un regulador de la retracción de las espinas sino que también se encuentra involucrado en la modulación del mantenimiento y morfología de las espinas. Más aún, estudios basados en la plasticidad sináptica sugieren que RhoA es rápidamente activada en las espinas estimuladas durante el crecimiento de las mismas, inducido por la liberación de glutamato y que la actividad de RhoA es esencial para la expresión estable del LTP (Rex et al. 2009; Murakoshi y Yasuda 2012). Por lo tanto, a pesar de que RhoA es requerida para la plasticidad estructural durante el LTP, su actividad necesita ser precisamente regulada y su sobre-activación es perjudicial.

Como puede observarse, la discrepancia en la vasta bibliografía en relación a la plasticidad sináptica estructural, la generación o eliminación y mantenimiento de las espinas dendríticas, nos lleva a interpretar que la morfogénesis de espinas es un fenómeno muy complejo y dinámico, que no puede ser entendido como una sola serie

lineal de eventos, sino que sería el balance entre distintas vías lo que llevaría hacia un destino u otro y el momento y la duración en que unas u otras vías estén activas también son factores determinantes para el resultado final. Asimismo, todos estos eventos pueden ser muy rápidos del orden de minutos o menos (Matsuzaki et al. 2004; Kasai et al. 2010). En nuestros diseños experimentales y estrategias de estudio intentamos recrear de alguna manera algunas señalizaciones, sin embargo la estrategia de sobre-expresión de plásmidos impide emular algunas rápidas señalizaciones. Otra manera de obtener evidencias sobre la fosforilación de Pak mediada por Cdk5, es midiendo los niveles de expresión de p-Pak-treonina212, lamentablemente no logramos obtener una buena señal con dicho anticuerpo. Actualmente, estamos realizando ensayos de la actividad de Pak, en muestras de ratones administrados con Anf en el esquema PDI, y esperamos encontrar una disminución de la actividad en aquellos sujetos administrados con el estimulante en relación a aquellos tratados con Sal.

En relación a la morfología de las espinas dendríticas observamos una tendencia a incrementar la densidad de espinas dendríticas del tipo “mushroom” y “thin” al estimular con Anf, solo cuando se sobre-expresa el plásmido eYFP o Pak-KD; mientras que esta tendencia es prevenida al sobre-expresar Pak-CA (fig. 23B y c). Este efecto es similar a cuando se sobre-expreso p25 y p35, donde bajo condiciones estimulantes la sobre-expresión de p25 tendía a incrementar el número de espinas dendríticas del tipo “mushroom”, mientras p35 prevenía dicho aumento y algo similar ocurre con las espinas “thin”, las cuales aumentan marcadamente bajo condiciones estimulantes cuando p25 o Pak-KD son sobre-expresadas (cabe destacar que en el caso de Pak-KD ese aumento no es estadísticamente significativo) similar a lo observado en el trabajo de Dietz y *col.*, 2012.

5.4 Participación de BDNF en la génesis de espinas dendríticas inducidas por anfetamina.

En base a los resultados discutidos hasta el momento, es indispensable que la quinasa Cdk5 este activa para mantener el aumento de espinas dendríticas inducidas por

Anf (fig 18) y no para generarlas, basándonos en los resultados que muestran que al sobre-expresar los activadores en condiciones fisiológicas no se observa un aumento de las espinas dendríticas, teniendo en cuenta que los activadores de Cdk5 son limitantes de la actividad de dicha quinasa. Esto podría significar que necesitaríamos de la presencia de un intermediario más entre Anf y Cdk5 para que se desarrolle dicho fenómeno. En referencia a esta última consideración, numerosos estudios observan un aumento de la liberación de el factor neurotrófico BDNF cuando se estimula con Anf (Le Foll *y col.*, 2005; McGinty *y col.*, 2011; Saylor y McGinty 2008; Shen *y col.*, 2014). Asimismo, huelgan evidencias que demuestran que BDNF estimula la generación de espinas dendríticas en hipocampo (Alonso *y col.*, 2004; Murphy *y col.*, 1998; Tyler y Pozzo-Miller 2003). Más interesante aún, un estudio reciente revela que para que se generen las espinas dendríticas inducidas por BDNF es necesaria la actividad de Cdk5. Específicamente, es necesario que Cdk5 fosforile en la serina 478 al receptor de BDNF, TrkB (activado), para que se desarrolle dicho fenómeno (Lai *y col.*, 2012).

Nuestros resultados preliminares demuestran en primer lugar, que el tratamiento por 30 min con Anf a cultivos disociados de neuronas hipocampales, sería suficiente para inducir la génesis de espinas dendríticas (fig. 24). Asimismo, al realizar ensayos por Western blot, provenientes de muestras de fracciones sinaptosomales de dichos cultivos, encontramos una tendencia a incrementar los niveles de expresión de p-TrkB (forma indirecta de medir liberación de BDNF) a partir de los 15 minutos de tratamiento con Anf llegando a niveles máximos a la hora y volviendo a valores similares a los controles a las 48 horas de tratamiento (fig. 27a). Sugiriendo que la exposición con el psicoestimulante estaría induciendo la liberación de la neurotrofina BDNF. Llamativamente, nuestros resultados preliminares muestran una tendencia a incrementar los niveles de expresión del receptor TrkB a partir de los 30 minutos de tratamiento con Anf llegando a niveles máximos a las 48 horas. Este rápido efecto parecería ser inducido específicamente por Anf, ya que al estimular la generación de espinas con glicina mas bicuculina (gli/bic), la densidad de espinas no varía con respecto al control, al menos en estos tiempos cortos (fig. 27b). Dicho aumento en los niveles de expresión del receptor, podría deberse como

consecuencia a la mayor liberación de BDNF. Sin embargo, con estos resultados preliminares no podemos saber si el aumento en los niveles de expresión concuerdan con mayor cantidad de TrkB activo en la membrana, y mas aún si estuviese inserto en membrana desconocemos si se encuentra dimerizado (ya que dicho receptor una vez activado por su neurotrofina se dimeriza con alguna de sus variantes). La señalización a través de TrkB ha sido involucrada con diversas funciones: crecimiento dendrítico, crecimiento axonal, y supervivencia celular (modulado a través de PI3K), también en la supervivencia, plasticidad sináptica y en la neurotransmisión (a través de PLC γ) y en la proliferación, diferenciación y supervivencia (a través de Erk/MAPK) (Fenner 2012). Lai y colaboradores (2012), observan que al estimular con BDNF los efectores clásicos río abajo de TrkB: AKT y ERK, no se ven afectados en el ratón transgénico de TrkB (TrkB-Ser478) que no puede ser fosforilado por Cdk5 en dichas serinas, por lo que Cdk5 no interfiere en la autofosforiación del receptor (en este caso Y515) y por consiguiente no obstaculiza la señalización “tradicional” de TrkB. A su vez, el receptor TrkB, señala a través de tres vías principalmente: PLC γ , PI3K y ERK/MAPK (Fenner, 2012). A partir de estas consideraciones, el aumento de la expresión del receptor puede estar dirigido a aumentar la señalización a través de algunas de estas vías o también como consecuencia de éstas.

Es importante tener en cuenta que existen dos isoformas del receptor TrkB que se encuentran ampliamente expresadas en el cerebro: TrkB total (versión completa) y el receptor truncado (TrkB Tr), el cual carece del dominio catalítico tirosina quinasa (Klein et al. 1990). Hasta el momento se conocen cuatro funciones de TrkB Tr: (1) dominante-negativo de la señalización de TrkB total (al heterodimerizar TrkB junto a TrkB Tr), (2) en la regulación de la concentración extracelular de BDNF, se une, internaliza y presenta BDNF a neuronas a través de mecanismos espacio-temporales dependientes. Las células no neuronales regulan los niveles extracelulares de BDNF expresando el TrkB Tr en la membrana plasmática (Fryer et al. 1997), (3) en cambios morfológicos de neuronas y células gliales (induce el crecimiento de las neuritas a través de un mecanismo independiente de BDNF) y (4) en la activación intracelular de vías de señalización. En el presente trabajo de tesis observamos una fuerte tendencia a incrementar los niveles de

expresión del receptor *trkB* tr luego del tratamiento por 48 horas con Anf. Esto podría deberse tal vez, a un mecanismo compensatorio, para regular negativamente los altos niveles de expresión de la versión completa del receptor (*TrkB* total) hallados en este trabajo, luego del tratamiento con el estimulante. Futuros experimentos deberían ser llevado a cabo para dilucidar la función de dicho aumento.

Por otra parte, encontramos una tendencia a incrementar progresivamente los niveles de expresión de p35 cuando los cultivos fueron tratados con Anf, sin embargo no son diferencias significativas (fig. 27d). Mientras que en el trabajo de Lai y colaboradores, encontraron que es necesario que el complejo Cdk5/p35 sea funcional para que se produzca el aumento en la densidad de espinas dendríticas inducidas por BDNF, sin embargo, no encontraron un aumento de p35 cuando se estimuló con el factor neurotrófico BDNF. El incremento observado en nuestro trabajo, también ocurrió cuando se estimuló con gli/bic, aunque no fue tan marcado como cuando se estimuló prolongadamente con Anf. Finalmente observamos, que tanto con la estimulación con gli/bic como con Anf hay una tendencia a incrementar los niveles de PSD95 (fig. 27e).

Con el objeto de indagar si es necesaria la activación del receptor *TrkB*, e indirectamente la presencia de BDNF en la morfogénesis de espinas dendríticas inducidas por Anf, evaluamos si la inhibición farmacológica con k252a del receptor *TrkB*, durante la estimulación con Anf prevenía la generación de espinas inducidas por dicho psicoestimulante. Nuestros resultados indicarían que la inhibición de la activación del receptor *TrkB*, previene el efecto espinogénico en respuesta al tratamiento por 30 min con Anf (fig. 25). Por lo tanto, podríamos sugerir que Anf estaría promoviendo la formación de nuevos contactos sinápticos estimulando la liberación de BDNF quien a su vez activaría receptores *TrkB*, los cuales serían fosforilados en la Serina 478 por Cdk5. Ha sido reportado que dicha fosforilación no afecta gravemente la expresión, localización y la capacidad general de señalización del *TrkB*, pero en cambio, regula aspectos específicos de dicha señalización como lo es la activación del GEF de Rac TIAM1, quien sería el responsable de generar las espinas dendríticas inducidas por BDNF (Lai y *col.*, 2012).

Al evaluar de manera indirecta la posible participación de BDNF en la

espinogénesis inducida por Anf en animales administrados *in vivo* con Anf en un PDI (lo discutido recientemente son experimentos *in vitro*), encontramos una tendencia a incrementar los niveles de expresión de p-TrkB a la hora post última inyección con respecto a su control, siendo esta tendencia mayor luego de las 4 horas post-inyección (fig. 28a). A diferencia de lo observado *in vitro*, observamos una tendencia a disminuir tanto los niveles de expresión de TrkB total como de TrkB Tr en aquellos sujetos que fueron administrados con Anf en relación a sus controles en los dos tiempos analizados (fig. 28 b y c). Por otra parte, observamos una tendencia a incrementar los niveles de expresión de Cdk5 y de su activador p35 a la hora post-última inyección con Anf con respecto a aquellos tratados con Sal (fig 28 d y e).

Por lo que, los resultados hallados *in vivo*, apoyan los obtenidos *in vitro*, en relación a que es necesaria la activación del receptor de BDNF (pTrkB) por su ligando para la génesis de espinas dendríticas bajo condiciones estimulantes. Mientras que las variaciones halladas en relación al receptor TrkB y TrkB Tr podrían deberse a diferencias del sistema empleado, la dosis y a los tiempos evaluados y disponibilidad de la droga en el cerebro por la administración ip del psicoestimulante.

Tomados en conjunto estos resultados y teniendo en cuenta las evidencias discutidas anteriormente, podríamos sugerir que el tratamiento con psicoestimulantes induciría la liberación de BDNF y la señalización de BDNF/TrkB sería fundamental para generar las nuevas espinas dendríticas. Por otra parte, Cdk5 dirigiría su actividad quinasa a fosforilar al receptor TrkB en su sitio consenso (en la serina 478) permitiendo, de esta manera, reclutar al GEF TIAM1 y de este modo regular la morfogénesis de espinas dendríticas inducidas por la droga, de manera similar a lo reportado por Lai y colaboradores 2012. Sin embargo nuevos experimentos en los cuales se verifique dicha fosforilación en la serina 478 serían necesarios para afirmar esta hipótesis.

6

Conclusiones

En resumen podemos concluir que la exposición a Anf tanto en condiciones *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* promueven la formación de espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA1, de hipocampo. Asimismo, es necesaria que la actividad de la quinasa Cdk5 este intacta para que se desarrolle dicho fenómeno, ya que al inhibirla prevenimos el aumento de espinas inducido por el estimulante. Cdk5 estaría modulando la morfogénesis de espinas a través de su activador específico p25. La activación de la quinasa mediada por p25 provocaría un aumento de la actividad de Cdk5, el cual podría estar involucrado en la modulación de la actividad de Pak, ya que tanto la inhibición de Cdk5 como la activación de Pak previenen el aumento en la densidad de espinas provocado por Anf. La inhibición de la actividad de Pak, quinasa encargada del remodelado del citoesqueleto de actina, provoca, en última instancia, un aumento del recambio de los filamentos de actina como producto de la disminución de los niveles de p-cofilina. Este aumento en la dinámica de actina podría ser el responsable de la morfogénesis y/o mantenimiento de espinas dendríticas inducida por la droga. Por otra parte, resultados preliminares mostraron un aumento de los niveles de pTrkB, sugiriendo que Anf induciría la liberación de la neurotrofina BDNF, quien activaría a su receptor TrkB, pudiendo ser blanco de la quinasa Cdk5, permitiendo reclutar de este modo, al GEF TIAM1, el cual activaría a la pequeña RhoGTPasa Rac, modulando el citoesqueleto de actina necesario para la espinogénesis inducida por Anf.

Con respecto a la morfología y a la maduración de las espinas dendríticas observamos que en cultivos organotípicos de hipocampo, Anf induce la generación de

espinas más grandes y estables, del tipo “*mushroom*” que presentarían mayor diversidad de organelas y sinapsis más fuertes ya que su PSD es más grande y alberga un mayor número de receptores post-sinápticos, (Hering y col., 2001), asimismo se observa una tendencia a aumentar la densidad de espinas del tipo “*stubby*” y “*thin*”; mientras que en los animales (*in vivo*), el psicoestimulante, induce la generación de espinas del tipo “*stubby*”, las cuales son estructuras un poco más plásticas, que se encuentran fuertemente unidas al eje dendrítico, pudiendo influenciar (al aumentar su frecuencia) de este modo la excitabilidad neuronal. Esta diferencia podría deberse a los diferentes sistemas empleados (*in vivo* versus *ex vivo*) como así también a la diferentes especies utilizadas (rata versus ratón). Por otra parte, la quinasa Cdk5 parece participar de la generación o mantenimiento de las espinas “*mushroom*” inducidas por la droga, ya que el aumento de este tipo de espinas en respuesta al psicoestimulante es prevenido cuando se inhibe a Cdk5. Cuando el activador p25 es sobre-expresado bajo condiciones estimulantes se observa un aumento de las espinas “*mushroom*” con respecto a su control sin Anf. Por otra parte, al sobre-expresar Pak-KD bajo condiciones estimulantes observamos una tendencia a aumentar la densidad de espinas “*mushroom*”, similar a lo observado cuando solo se sobre-expresa eYFP. Este conjuntos de resultados sugieren que Cdk5/p25 podría estar participando del mantenimiento y maduración de las espinas “*mushroom*” generadas en respuesta a la Anf, a través de la disminución de la señalización de Pak.

Teniendo en cuenta que el abuso de estimulantes adictivos, tales como anfetaminas y cocaína es común en la adolescencia, edad en la que evidentemente están aumentadas las tendencias adictivas en relación a los adultos, y que además los psicoestimulantes son comúnmente usados como tratamiento para desórdenes del tipo Déficit de Atención con Hiperactividad, es de suma importancia comprender en detalle las respuestas neuroadaptativas que ocurren en el cerebro inmaduro durante la administración de estos agentes. Mas aún, comprender los eventos moleculares y celulares subyacentes a la plasticidad sináptica inducida por la administración de estas drogas, puede brindarnos blancos potenciales para desarrollar terapias más eficaces. Finalmente es importante estudiar dicha plasticidad en regiones cerebrales que han sido

subestimadas, como lo es el caso del hipocampo, por no presentar una rica inervación dopaminérgica pero que participa de procesos claves involucrados en el desarrollo de las adicciones, tales como la memoria y el aprendizaje.

Bibliografía

- Ahn, S. *y col.*, 2013. Repeated injections of D-Amphetamine evoke rapid and dynamic changes in phase synchrony between the prefrontal cortex and hippocampus. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 7(July), p.92.
- Allen, P.B. *y col.*, 2006. Distinct roles for spinophilin and neurabin in dopamine-mediated plasticity. *Neuroscience*, 140(3), pp.897–911.
- Allison, D.W. *y col.*, 1998. Role of Actin in Anchoring Postsynaptic Receptors in Cultured Hippocampal Neurons : Differential Attachment of NMDA versus AMPA Receptors. , 18(7), pp.2423–2436.
- Alonso, M., Medina, J.H. *y* Pozzo-Miller, L., 2004. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learning y memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 11(2), pp.172–8.
- Andersen, P. *y col.*, 2006. *The hippocampus book*.
- Angelo, M. *y col.*, 2003. Improved reversal learning and altered fear conditioning in transgenic mice with regionally restricted p25 expression. *European Journal of Neuroscience*, 18(2), pp.423–431.
- Angelo, M., Plattner, F. *y* Giese, K.P., 2006. Cyclin-dependent kinase 5 in synaptic plasticity, learning and memory. *Journal of neurochemistry*, 99(2), pp.353–70.
- Bannerman, D.M. *y col.*, 2004. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 28(3), pp.273–83.
- Banker, G. *y* Goslin, K. 1998. *Culturing Nerve Cells*. 2nd Edition.
- Barnett, D.G.S. *y* Bibb, J. a, 2011. The role of Cdk5 in cognition and neuropsychiatric and neurological pathology. *Brain research bulletin*, 85(1-2), pp.9–13.
- Benavides, D.R. *y* Bibb, J. a, 2004. Role of Cdk5 in drug abuse and plasticity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1025, pp.335–44.
- Bergson, C. *y col.*, 1995. Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(12), pp.7821–36.
- Berke, J.D. *y* Hyman, S.E., 2000. Addiction, Dopamine, and the Molecular Mechanisms of Memory. *Neuron*, 25(3), pp.515–532.
- Bibb, J. a *y col.*, 2001. Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature*, 410(6826), pp.376–80.
- Bibb, J. a *y col.*, 1999. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature*, 402(6762), pp.669–71.

- Birkenfeld, J. *y col.*, 2008. Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF: is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis? *Trends in cell biology*, 18(5), pp.210–9.
- Blanchoin, L. *y col.*, 2000. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature*, 404(6781), pp.1007–11.
- Blanpied, T.A., Scott, D.B. *y Ehlers, M.D.*, 2002. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron*, 36(3), pp.435–49.
- Boda, B., Jourdain, L. *y Muller, D.*, 2008. Distinct, but compensatory roles of PAK1 and PAK3 in spine morphogenesis. *Hippocampus*, 18(9), pp.857–61.
- Boikess, S.R. *y Marshall, J.F.*, 2008. A sensitizing d-amphetamine regimen induces long-lasting spinophilin protein upregulation in the rat striatum and limbic forebrain. *The European journal of neuroscience*, 28(10), pp.2099–107.
- Borgkvist, A. *y col.*, 2012. Dopamine in the hippocampus is cleared by the norepinephrine transporter. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 15(4), pp.531–40.
- Bosco, E.E., Mulloy, J.C. *y Zheng, Y.*, 2009. Rac1 GTPase: a “Rac” of all trades. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(3), pp.370–4.
- Bourne, J. *y Harris, K.M.*, 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current opinion in neurobiology*, 17(3), pp.381–6.
- Bourne, J.N. *y Harris, K.M.*, 2008. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual review of neuroscience*, 31, pp.47–67.
- Brinkkoetter, P.T. *y col.*, 2009. Cyclin I activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells. *The Journal of clinical investigation*, 119(10), pp.3089–101.
- Burwell, R.D. *y Agster, K.L.*, 2008. Anatomy of the Hippocampus and the Declarative Memory System. H. Eichenbaum (Ed.), *Memory Systems*, 3, pp.47–66.
- De Camilli, P. *y col.*, 1983. Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes. *The Journal of cell biology*, 96(5), pp.1355–73.
- Chang, M.-Y. *y col.*, 2001. Protein kinase C-mediated functional regulation of dopamine transporter is not achieved by direct phosphorylation of the dopamine transporter protein. *Journal of Neurochemistry*, 77(3), pp.754–761.
- Chapleau, C.A. *y Pozzo-Miller, L.*, 2008. Activity-Dependent Structural Plasticity of Dendritic Spines. In *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*. pp. 695–722.

- Chen, L.Y. y *col.*, 2010. Physiological activation of synaptic Rac>PAK (p-21 activated kinase) signaling is defective in a mouse model of fragile X syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(33), pp.10977–84.
- Chen, R., Han, D.D. y Gu, H.H., 2005. A triple mutation in the second transmembrane domain of mouse dopamine transporter markedly decreases sensitivity to cocaine and methylphenidate. *Journal of neurochemistry*, 94(2), pp.352–9.
- Cheung, Z.H. y *col.*, 2007. Cdk5 is involved in BDNF-stimulated dendritic growth in hippocampal neurons. *PLoS biology*, 5(4), p.e63.
- Cheung, Z.H. y Ip, N.Y., 2007. The roles of cyclin-dependent kinase 5 in dendrite and synapse development. *Biotechnology journal*, 2(8), pp.949–57.
- Chi, L. y Reith, M.E.A., 2003. Substrate-induced trafficking of the dopamine transporter in heterologously expressing cells and in rat striatal synaptosomal preparations. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 307(2), pp.729–36.
- Cooney, J.R. y *col.*, 2002. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(6), pp.2215–24.
- Crombag, H.S. y *col.*, 2005. Opposite effects of amphetamine self-administration experience on dendritic spines in the medial and orbital prefrontal cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 15(3), pp.341–8.
- Cruz, J.C. y *col.*, 2003. Aberrant Cdk5 Activation by p25 Triggers Pathological Events Leading to Neurodegeneration and Neurofibrillary Tangles. *Neuron*, 40(3), pp.471–483.
- Dahlin, a y *col.*, 2007. Expression and immunolocalization of the plasma membrane monoamine transporter in the brain. *Neuroscience*, 146(3), pp.1193–211.
- DeKosky, S.T., 2002. Neurobiology and molecular biology of Alzheimer's disease. *Revista de neurologia*, 35(8), pp.752–60.
- Delalle, I. y *col.*, 1997. Temporal and spatial patterns of expression of p35, a regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5, in the nervous system of the mouse. *Journal of neurocytology*, 26(5), pp.283–96.
- Deng, J.V. y *col.*, 2010. MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants. *Nature neuroscience*, 13(9), pp.1128–1136.
- Dhavan, R. y Tsai, L.H., 2001. A decade of CDK5. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(10), pp.749–59.
- Dietz, D.M. y *col.*, 2012. Rac1 is essential in cocaine-induced structural plasticity of nucleus accumbens neurons. *Nature neuroscience*, 15(6), pp.891–6.

- Dodt, H. *y col.*, 2008. The Rab5 guanylate exchange factor Rin1 regulates endocytosis of the EphA4 receptor in mature excitatory neurons. , 105(34), pp.1–6.
- Dong, Y. *y col.*, 2005. Cocaine-induced plasticity of intrinsic membrane properties in prefrontal cortex pyramidal neurons: adaptations in potassium currents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(4), pp.936–40.
- Dumitriu, D. *y col.*, 2012. Subregional, dendritic compartment, and spine subtype specificity in cocaine regulation of dendritic spines in the nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(20), pp.6957–66.
- Ehrlich, M.E. *y col.*, 2002. Periadolescent mice show enhanced DeltaFosB upregulation in response to cocaine and amphetamine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(21), pp.9155–9.
- Eisch, A.J. *y Harburg, G.C.*, 2006. Opiates, psychostimulants, and adult hippocampal neurogenesis: Insights for addiction and stem cell biology. *Hippocampus*, 16(3), pp.271–86.
- Evans, D.B. *y col.*, 2000. Tau phosphorylation at serine 396 and serine 404 by human recombinant tau protein kinase II inhibits tau's ability to promote microtubule assembly. *The Journal of biological chemistry*, 275(32), pp.24977–83.
- Fenner, B.M., 2012. Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine y growth factor reviews*, 23(1-2), pp.15–24.
- Fischer, A. *y col.*, 2003. Cdk5 in the adult non-demented brain. *Current drug targets. CNS and neurological disorders*, 2(6), pp.375–81.
- Fischer, A. *y col.*, 2005. Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory. *Neuron*, 48(5), pp.825–38.
- Fischer, M. *y col.*, 2000. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nature neuroscience*, 3(9), pp.887–94.
- Fischer, M. *y col.*, 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, 20(5), pp.847–54.
- Fiuza, M., González-González, I. *y Pérez-Otaño, I.*, 2013. GluN3A expression restricts spine maturation via inhibition of GIT1/Rac1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), pp.20807–12.
- Fletcher, a. I., 1999. Regulation of Exocytosis by Cyclin-dependent Kinase 5 via Phosphorylation of Munc18. *Journal of Biological Chemistry*, 274(7), pp.4027–4035.
- Floresco, S.B. *y col.*, 2001. Modulation of hippocampal and amygdalar-evoked activity of nucleus accumbens neurons by dopamine: cellular mechanisms of input selection. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(8), pp.2851–60.

- Le Foll, B., Diaz, J. y Sokoloff, P., 2005. A single cocaine exposure increases BDNF and D3 receptor expression: implications for drug-conditioning. *Neuroreport*, 16(2), pp.175–8.
- Fryer, R.H., Kaplan, D.R. y Kromer, L.F., 1997. Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Experimental neurology*, 148(2), pp.616–27.
- Fu, A.K. y *col.*, 2001. Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction. *Nature neuroscience*, 4(4), pp.374–81.
- Fu, A.K.Y. y Ip, N.Y., 2007. Cyclin-dependent kinase 5 links extracellular cues to actin cytoskeleton during dendritic spine development. *Cell adhesion y migration*, 1(2), pp.110–2.
- Fukata, M., Nakagawa, M. y Kaibuchi, K., 2003. Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(5), pp.590–597.
- Furman, C. a y *col.*, 2009. Dopamine and amphetamine rapidly increase dopamine transporter trafficking to the surface: live-cell imaging using total internal reflection fluorescence microscopy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(10), pp.3328–36.
- Gao, C., Sun, X. y Wolf, M.E., 2006. Activation of D1 dopamine receptors increases surface expression of AMPA receptors and facilitates their synaptic incorporation in cultured hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry*, 98(5), pp.1664–77.
- Gary Banker and Kimberly Goslin, *Books Culturing Nerve Cells 2nd Edition*,
- Gasbarri, A. y *col.*, 1991. Organization of the projections from the ventral tegmental area of Tsai to the hippocampal formation in the rat. *Journal für Hirnforschung*, 32(4), pp.429–37.
- Ghosh, M. y *col.*, 2004. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5671), pp.743–6.
- Golden, S. a y Russo, S.J., 2012. Mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(10).
- Goldsmith, S.K. y Joyce, J.N., 1994. Dopamine D2 receptor expression in hippocampus and parahippocampal cortex of rat, cat, and human in relation to tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers. *Hippocampus*, 4(3), pp.354–73.
- Goley, E.D. y Welch, M.D., 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(10), pp.713–26.
- Greengard, P., 2001. The neurobiology of dopamine signaling. *Bioscience reports*, 21(3), pp.247–69.
- Greengard, P., Allen, P.B. y Nairn, A.C., 1999. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-

- 32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron*, 23(3), pp.435–47.
- Grigston, J.C. *y col.*, 2005. Translation of an integral membrane protein in distal dendrites of hippocampal neurons. *The European journal of neuroscience*, 21(6), pp.1457–68.
- Groenewegen, H.J. *y col.*, 1987. Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, 23(1), pp.103–20.
- Grove, M. *y col.*, 2004. ABI2-deficient mice exhibit defective cell migration, aberrant dendritic spine morphogenesis, and deficits in learning and memory. *Molecular and cellular biology*, 24(24), pp.10905–22.
- Gu, Y., Rosenblatt, J. *y* Morgan, D.O., 1992. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *The EMBO journal*, 11(11), pp.3995–4005.
- Guan, J.-S. *y col.*, 2011. Cdk5 is required for memory function and hippocampal plasticity via the cAMP signaling pathway. *PLoS one*, 6(9), p.e25735.
- Gungabissoon, R. *a y* Bamberg, J.R., 2003. Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 51(4), pp.411–20.
- Harada, T. *y col.*, 2001. ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nature cell biology*, 3(5), pp.453–9.
- Harris, K.M., Jensen, F.E. *y* 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 12(7), pp.2685–705.
- Harris, K.M. *y* Kater, S.B., 1994. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual review of neuroscience*, 17, pp.341–71.
- Hasbani, M.J. *y col.*, 2001. Dendritic spines lost during glutamate receptor activation reemerge at original sites of synaptic contact. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(7), pp.2393–403.
- Hawasli, A.H. *y col.*, 2007. Cyclin-dependent kinase 5 governs learning and synaptic plasticity via control of NMDAR degradation. *Nature neuroscience*, 10(7), pp.880–6.
- He, L. *y col.*, 2011. The neuronal p35 activator of Cdk5 is a novel F-actin binding and bundling protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(9), pp.1633–43.
- Heasman, S.J. *y* Ridley, A.J., 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(9), pp.690–701.
- Hemmings, H.C., Nairn, A.C. *y* Greengard, P., 1984. DARPP-32, a dopamine- and adenosine

- 3':5'-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein. II. Comparison of the kinetics of phosphorylation of DARPP-32 and phosphatase inhibitor 1. *The Journal of biological chemistry*, 259(23), pp.14491–7.
- Hering, H. y Sheng, M., 2003. Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(37), pp.11759–69.
- Hering, H. y Sheng, M., 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(12), pp.880–8.
- Honkura, N. y *col.*, 2008. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, 57(5), pp.719–29.
- Hoover, B.R. y *col.*, 2007. Rapid regulation of dopamine transporters by tyrosine kinases in rat neuronal preparations. *Journal of neurochemistry*, 101(5), pp.1258–71.
- Horner, C.H., 1993. Plasticity of the dendritic spine. *Progress in Neurobiology*, 41(3), pp.281–321.
- Horton, A.C. y Ehlers, M.D., 2004. Secretory trafficking in neuronal dendrites. *Nature cell biology*, 6(7), pp.585–91.
- Hosokawa, T. y *col.*, 2006. Enhanced activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II upon downregulation of cyclin-dependent kinase 5-p35. *Journal of neuroscience research*, 84(4), pp.747–54.
- Hotulainen, P. y *col.*, 2005. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Molecular biology of the cell*, 16(2), pp.649–64.
- Hotulainen, P. y *col.*, 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *The Journal of cell biology*, 185(2), pp.323–39.
- Humbert, S., Lanier, L.M. y Tsai, L.H., 2000. Synaptic localization of p39, a neuronal activator of cdk5. *Neuroreport*, 11(10), pp.2213–6.
- Hyman, S.E. y Malenka, R.C., 2001. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(10), pp.695–703.
- Ikemoto, S. y Panksepp, J., 1999. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain research. Brain research reviews*, 31(1), pp.6–41.
- Impey, S. y *col.*, 2010. An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Molecular and cellular neurosciences*, 43(1), pp.146–56.
- Johnson, L. a y *col.*, 2005. Rapid delivery of the dopamine transporter to the plasmalemmal membrane upon amphetamine stimulation. *Neuropharmacology*,

49(6), pp.750–8.

- Kaech, S. y Banker, G., 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nature protocols*, 1(5), pp.2406–15.
- Kahlig, K.M. y Galli, A., 2003. Regulation of dopamine transporter function and plasma membrane expression by dopamine, amphetamine, and cocaine. *European Journal of Pharmacology*, 479(1-3), pp.153–158.
- Kalivas, P.W. y *col.*, 1992. Cellular mechanisms of behavioral sensitization to drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 654, pp.128–35.
- Kalivas, P.W., 2007. Cocaine and amphetamine-like psychostimulants: neurocircuitry and glutamate neuroplasticity. *Dialogues in clinical neuroscience*, 9(4), pp.389–97.
- Kalivas, P.W., 2009. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(8), pp.561–72.
- Kansy, J.W. y *col.*, 2004. Identification of tyrosine hydroxylase as a physiological substrate for Cdk5. *Journal of neurochemistry*, 91(2), pp.374–84.
- Kasai, H. y *col.*, 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in neurosciences*, 33(3), pp.121–9.
- Kasai, H. y *col.*, 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in neurosciences*, 26(7), pp.360–8.
- Kauer, J. a y Malenka, R.C., 2007. Synaptic plasticity and addiction. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(11), pp.844–58.
- Kelley, A. y Domesick, V., 1982. The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience*, 7(10), pp.2321–35.
- Kelley, A.E., 2004. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron*, 44(1), pp.161–79.
- Kerokoski, P. y *col.*, 2004. Both N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors mediate glutamate-induced cleavage of the cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activator p35 in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience letters*, 368(2), pp.181–5.
- Kim, J. y *col.*, 2007. Regulation of dendritic excitability by activity-dependent trafficking of the A-type K⁺ channel subunit Kv4.2 in hippocampal neurons. *Neuron*, 54(6), pp.933–47.
- Kim, J.S. y *col.*, 1981. Effects of chronic amphetamine treatment on the glutamate concentration in cerebrospinal fluid and brain: implications for a theory of schizophrenia. *Neuroscience letters*, 24(1), pp.93–6.
- Kim, Y. y *col.*, 2006. Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature*, 442(7104), pp.814–7.

- Kiraly, D.D. *y col.*, 2010. Behavioral and morphological responses to cocaine require kalirin7. *Biological psychiatry*, 68(3), pp.249–55.
- Klein, R. *y col.*, 1990. The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell*, 61(4), pp.647–56.
- Ko, J. *y col.*, 2001. p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(17), pp.6758–71.
- Kobayashi, H. *y col.*, 2014. Phosphorylation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) at Tyr-15 is inhibited by Cdk5 activators and does not contribute to the activation of Cdk5. *The Journal of biological chemistry*, 289(28), pp.19627–36.
- Koh, I.Y. *y col.*, 2002. An image analysis algorithm for dendritic spines. *Neural computation*, 14(6), pp.1283–310.
- Kolb, B. *y col.*, 2003. Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), pp.10523–8.
- Kolb, B. *y Whishaw, I.Q.*, 1998. Brain plasticity and behavior. *Annual review of psychology*, 49, pp.43–64.
- Koob, G., 1992. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in pharmacological sciences*, 231.
- Korobova, F. *y Svitkina, T.*, 2010. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Molecular biology of the cell*, 21(1), pp.165–76.
- Kreek, M.J., 2001. Drug addictions. Molecular and cellular endpoints. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 937, pp.27–49.
- Kunda, P. *y col.*, 2001. Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(7), pp.2361–72.
- Lai, K.-O. *y col.*, 2012. TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory. *Nature neuroscience*, 15(11), pp.1506–15.
- Lai, K.-O. *y Ip, N.Y.*, 2009. Recent advances in understanding the roles of Cdk5 in synaptic plasticity. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(8), pp.741–5.
- Lamprecht, R. *y LeDoux, J.*, 2004. Structural plasticity and memory. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(1), pp.45–54.
- Lee, K.-W. *y col.*, 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), pp.3399–

404.

- Lee, M.S. *y col.*, 2000. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*, 405(6784), pp.360–4.
- Lendvai, B. *y col.*, 2000. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature*, 404(6780), pp.876–81.
- Levey, A.I. *y col.*, 1993. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(19), pp.8861–5.
- Leviel, V., 2001. The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochemistry International*, 38(2), pp.83–106.
- Li, B.S. *y col.*, 2000. Integrin alpha(1) beta(1)-mediated activation of cyclin-dependent kinase 5 activity is involved in neurite outgrowth and human neurofilament protein H Lys-Ser-Pro tail domain phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(16), pp.6055–62.
- Li, B.S. *y col.*, 2001. Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), pp.12742–7.
- Li, Y., Kolb, B. *y* Robinson, T.E., 2003. The location of persistent amphetamine-induced changes in the density of dendritic spines on medium spiny neurons in the nucleus accumbens and caudate-putamen. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 28(6), pp.1082–5.
- Li, Z. *y col.*, 2004. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, 119(6), pp.873–87.
- Lilja, L. *y col.*, 2004. Cyclin-dependent kinase 5 associated with p39 promotes Munc18-1 phosphorylation and Ca(2+)-dependent exocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 279(28), pp.29534–41.
- Lisman, J., Schulman, H. *y* Cline, H., 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(3), pp.175–90.
- Little, K.Y. *y col.*, 2002. Cocaine induction of dopamine transporter trafficking to the plasma membrane. *Molecular pharmacology*, 61(2), pp.436–45.
- Loder, M.K. *y* Melikian, H.E., 2003. The dopamine transporter constitutively internalizes and recycles in a protein kinase C-regulated manner in stably transfected PC12 cell lines. *The Journal of biological chemistry*, 278(24), pp.22168–74.
- London, M., 2005. History of addiction: a UK perspective. *The American journal on addictions / American Academy of Psychiatrists in Alcoholism and Addictions*, 14(2), pp.97–105.
- Lu, W. *y col.*, 2001. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of

- new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 29(1), pp.243–54.
- Luo, L. y *col.*, 1996. Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature*, 379(6568), pp.837–40.
- Luo, L., 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(3), pp.173–80.
- Marrs, G.S., Green, S.H. y Dailey, M.E., 2001. Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nature neuroscience*, 4(10), pp.1006–13.
- Matsuura, I. y Wang, J.H., 1996. Demonstration of Cyclin-dependent Kinase Inhibitory Serine/Threonine Kinase in Bovine Thymus. *Journal of Biological Chemistry*, 271(10), pp.5443–5450.
- Matsuzaki, M. y *col.*, 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature neuroscience*, 4(11), pp.1086–92.
- Matsuzaki, M. y *col.*, 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429(6993), pp.761–6.
- Matus, A., Brinkhaus, H. y Wagner, U., 2000. Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses. *Hippocampus*, 10(5), pp.555–60.
- McGinty, J.F. y *col.*, 2011. The Role of BDNF/TrkB Signaling in Acute Amphetamine-Induced Locomotor Activity and Opioid Peptide Gene Expression in the Rat Dorsal Striatum. *Frontiers in systems neuroscience*, 5(July), p.60.
- Melikian, H.E., 2004. Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation. *Pharmacology y therapeutics*, 104(1), pp.17–27.
- Melikian, H.E. y Buckley, K.M., 1999. Membrane trafficking regulates the activity of the human dopamine transporter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(18), pp.7699–710.
- Meng, Y. y *col.*, 2002. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron*, 35(1), pp.121–33.
- Menna, E. y *col.*, 2009. Eps8 regulates axonal filopodia in hippocampal neurons in response to brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *PLoS biology*, 7(6), p.e1000138.
- Meredith, G.E., Callen, S. y Scheuer, D. a, 2002. Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdala, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. *Brain research*, 949(1-2), pp.218–27.
- Miller, M. y Peters, A., 1981. Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron

- microscope study of pyramidal neurons. *Journal of Comparative Neurology*.
- Milner, T.A. y Bacon, C.E., 1989. Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *The Journal of comparative neurology*, 281(3), pp.479–95.
- Mlewski, E.C. y col., 2008. Transient enhanced expression of Cdk5 activator p25 after acute and chronic d-amphetamine administration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139, pp.89–102.
- Mlewski, E.C., Arias, C. y Paglini, G., 2014. Behavioral sensitization to amphetamine involves enhanced expression of p35 and Cdk5 activity in a two-injection protocol. *sent Article*.
- Modi, P.K. y col., 2012. Interplay between MEK-ERK signaling, cyclin D1, and cyclin-dependent kinase 5 regulates cell cycle reentry and apoptosis of neurons. *Molecular biology of the cell*, 23(18), pp.3722–30.
- Morabito, M. a, Sheng, M. y Tsai, L.-H., 2004. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(4), pp.865–76.
- Murakoshi, H. y Yasuda, R., 2012. Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines. *Trends in neurosciences*, 35(2), pp.135–43.
- Murphy, D.D., Cole, N.B. y Segal, M., 1998. Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(19), pp.11412–7.
- Nairn, A.C. y col., 2004. The role of DARPP-32 in the actions of drugs of abuse. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, pp.14–23.
- Nakayama, a Y. y Luo, L., 2000. Intracellular signaling pathways that regulate dendritic spine morphogenesis. *Hippocampus*, 10(5), pp.582–6.
- Nestler, E.J., 2001. Psychogenomics: opportunities for understanding addiction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(21), pp.8324–7.
- Nestler, E.J., Kelz, M.B. y Chen, J., 1999. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain research*, 835(1), pp.10–7.
- Neves, G., Cooke, S.F. y Bliss, T.V.P., 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(1), pp.65–75.
- Newpher, T.M. y Ehlers, M.D., 2009. Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends in cell biology*, 19(5), pp.218–27.

- Nguyen, M.D., Larivière, R.C. y Julien, J.P., 2001. Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron*, 30(1), pp.135–47.
- Nicholson-Dykstra, S., Higgs, H.N. y Harris, E.S., 2005. Actin dynamics: growth from dendritic branches. *Current biology : CB*, 15(9), pp.R346–57.
- Nicola, S.M., Surmeier, J. y Malenka, R.C., 2000. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annual review of neuroscience*, 23, pp.185–215.
- Niethammer, M. y *col.*, 2000. NUDEL Is a Novel Cdk5 Substrate that Associates with LIS1 and Cytoplasmic Dynein. *Neuron*, 28(3), pp.697–711.
- Nikolic, M. y *col.*, 1998. The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature*, 395(6698), pp.194–8.
- Nimchinsky, E. a, Sabatini, B.L. y Svoboda, K., 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annual review of physiology*, 64, pp.313–53.
- Nirenberg, M.J. y *col.*, 1997. The dopamine transporter: comparative ultrastructure of dopaminergic axons in limbic and motor compartments of the nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(18), pp.6899–907.
- Nirenberg, M.J. y *col.*, 1996. Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(13), pp.4135–45.
- Nishi, a y *col.*, 2000. Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), pp.12840–5.
- Nobes, C. y Hall, A., 1994. Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Current opinion in genetics y development*, 4(1), pp.77–81.
- Noguchi, J. y *col.*, 2005. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. *Neuron*, 46(4), pp.609–22.
- Noraberg, J. y *col.*, 2005. Organotypic Hippocampal Slice Cultures for Studies of Brain Damage Neuroprotection and Neurorepair. *Current Drug Target -CNS y Neurological Disorders*, 4(4), pp.435–452.
- Norrholm, S.D. y *col.*, 2003. Cocaine-induced proliferation of dendritic spines in nucleus accumbens is dependent on the activity of cyclin-dependent kinase-5. *Neuroscience*, 116(1), pp.19–22.
- Oertner, T.G. y Matus, A., 2005. Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell calcium*, 37(5), pp.477–82.

- Ohshima, T. *y col.*, 2005. Impairment of hippocampal long-term depression and defective spatial learning and memory in p35 mice. *Journal of neurochemistry*, 94(4), pp.917–25.
- Okabe, S., 2007. Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Molecular and cellular neurosciences*, 34(4), pp.503–18.
- Ornstein, T.J. *y col.*, 2000. Profiles of cognitive dysfunction in chronic amphetamine and heroin abusers. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 23(2), pp.113–26.
- Ostroff, L.E. *y col.*, 2002. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron*, 35(3), pp.535–45.
- Paglini, G. *y col.*, 1998. Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(23), pp.9858–69.
- Paglini, G. *y col.*, 2001. The Cdk5-p35 kinase associates with the Golgi apparatus and regulates membrane traffic. *EMBO reports*, 2(12), pp.1139–44.
- Park, M. *y col.*, 2006. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron*, 52(5), pp.817–30.
- Park, M. *y col.*, 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5692), pp.1972–5.
- Park, Y.H. *y col.*, 2002. Repeated, intermittent treatment with amphetamine induces neurite outgrowth in rat pheochromocytoma cells (PC12 cells). *Brain research*, 951(1), pp.43–52.
- Patrick, G.N. *y col.*, 1998. p35, the Neuronal-specific Activator of Cyclin-dependent Kinase 5 (Cdk5) Is Degraded by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 273(37), pp.24057–24064.
- Pei, J.J. *y col.*, 1998. Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain research*, 797(2), pp.267–77.
- Peters, A. *y Kaiserman-Abramof, I.R.*, 1969. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The synapses upon dendritic spines. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)*, 100(4), pp.487–506.
- Petrini, E.M. *y col.*, 2009. Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation. *Neuron*, 63(1), pp.92–105.
- Pigino, G. *y col.*, 1997. Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *Journal of cell science*, 110 (Pt 2, pp.257–70.

- Pilpel, Y. y Segal, M., 2005. Rapid WAVE dynamics in dendritic spines of cultured hippocampal neurons is mediated by actin polymerization. *Journal of neurochemistry*, 95(5), pp.1401–10.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. y Mullins, R.D., 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 29, pp.545–76.
- Pollard, T.D. y Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4), pp.453–65.
- Poon, R.Y.C., Lew, J. y Hunter, T., 1997. Identification of Functional Domains in the Neuronal Cdk5 Activator Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 272(9), pp.5703–5708.
- Poore, C.P. y *col.*, 2010. Cdk5-mediated phosphorylation of delta-catenin regulates its localization and GluR2-mediated synaptic activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(25), pp.8457–67.
- Portera-Cailliau, C., Pan, D.T. y Yuste, R., 2003. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(18), pp.7129–42.
- Pulipparacharuvil, S. y *col.*, 2008. Cocaine regulates MEF2 to control synaptic and behavioral plasticity. *Neuron*, 59(4), pp.621–33.
- Rademacher, D.J. y *col.*, 2006. The neural substrates of amphetamine conditioned place preference: implications for the formation of conditioned stimulus-reward associations. *The European journal of neuroscience*, 24(7), pp.2089–97.
- Raftopoulou, M. y Hall, A., 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology*, 265(1), pp.23–32.
- Rampon, C. y *col.*, 2000. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), pp.12880–4.
- Rashid, T., Banerjee, M. y Nikolic, M., 2001. Phosphorylation of Pak1 by the p35/Cdk5 kinase affects neuronal morphology. *The Journal of biological chemistry*, 276(52), pp.49043–52.
- Rehm, J. y *col.*, 2009. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet*, 373(9682), pp.2223–33.
- Rex, C.S. y *col.*, 2009. Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation. *The Journal of cell biology*, 186(1), pp.85–97.
- Richards, T.L. y Zahniser, N.R., 2009. Rapid substrate-induced down-regulation in function and surface localization of dopamine transporters: rat dorsal striatum versus nucleus

- accumbens. *Journal of neurochemistry*, 108(6), pp.1575–84.
- Robinson, T. y Kolb, B., 1997. Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *The Journal of neuroscience*, 17(21), pp.8491–8497.
- Robinson, T.E. y Kolb, B., 1999. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *The European journal of neuroscience*, 11(5), pp.1598–604.
- Robinson, T.E. y Kolb, B., 2004. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, pp.33–46.
- Robinson TE, B.J., 1986. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain research*, 2(396), pp.157–98.
- Robinson TE, B.K., 1993. The neural basis of drug cra. *Brain Res. Brain Res Rev*, 3(18).
- Rosenkranz, J.A. y Grace, A.A., 2001. Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(11), pp.4090–103.
- Rusakov, D. a., Stewart, M.G. y Korogod, S.M., 1996. Branching of active dendritic spines as a mechanism for controlling synaptic efficacy. *Neuroscience*, 75(1), pp.315–323.
- Russo, S.J. y col., 2010. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends in neurosciences*, 33(6), pp.267–76.
- Ryan, X.P. y col., 2005. The Rho-specific GEF Lfc interacts with neurabin and spinophilin to regulate dendritic spine morphology. *Neuron*, 47(1), pp.85–100.
- Sabatini, B.L., Maravall, M. y Svoboda, K., 2001. Ca(2+) signaling in dendritic spines. *Current opinion in neurobiology*, 11(3), pp.349–56.
- Sakimura, K. y col., 1995. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature*, 373(6510), pp.151–5.
- Samuels, B.A. y col., 2007. Cdk5 promotes synaptogenesis by regulating the subcellular distribution of the MAGUK family member CASK. *Neuron*, 56(5), pp.823–37.
- Saunders, C. y col., 2000. Amphetamine-induced loss of human dopamine transporter activity: an internalization-dependent and cocaine-sensitive mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), pp.6850–5.
- Saylor, A.J. y McGinty, J.F., 2008. Amphetamine-induced locomotion and gene expression are altered in BDNF heterozygous mice. *Genes, brain, and behavior*, 7(8), pp.906–14.
- Schmidt, H. y 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), pp.229–43.
- Schoenbaum G, Saddoris MP, Ramus SJ, Shaham Y, S.B., 2004. Cocaine-experienced rats exhibit learning deficits in a task sensitive to orbitofrontal cortex lesions. *Eur J Neurosci.*, 7, pp.1997–2002.
- Scott, L. y Aperia, a, 2009. Interaction between N-methyl-D-aspartic acid receptors and D1 dopamine receptors: an important mechanism for brain plasticity. *Neuroscience*, 158(1), pp.62–6.
- Seamans, J.K. y Yang, C.R., 2004. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in neurobiology*, 74(1), pp.1–58.
- Sekino, Y., Kojima, N. y Shirao, T., 2007. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry international*, 51(2-4), pp.92–104.
- Shah, K. y Lahiri, D.K., 2014. Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation. *Journal of cell science*, 127(Pt 11), pp.2391–400.
- Shen, F., Meredith, G.E. y Napier, T.C., 2006. Amphetamine-induced place preference and conditioned motor sensitization requires activation of tyrosine kinase receptors in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(43), pp.11041–51.
- Shen, H. y *col.*, 2009. Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(9), pp.2876–84.
- Shen, Y.-L. y *col.*, 2014. Elevated BDNF mRNA expression in the medial prefrontal cortex after d-amphetamine reinstated conditioned place preference in rats. *Neuroscience*, 263, pp.88–95.
- Shilling, P.D., Kelsoe, J.R. y Segal, D.S., 1997. Dopamine transporter mRNA is up-regulated in the substantia nigra and the ventral tegmental area of amphetamine-sensitized rats. *Neuroscience Letters*, 236(3), pp.131–134.
- De Simoni, A. y Yu, L.M.Y., 2006. Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: interface method. *Nature protocols*, 1(3), pp.1439–45.
- Soderling, S.H. y *col.*, 2007. A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(2), pp.355–65.
- Sorg, B.A. y *col.*, 1997. Repeated Daily Cocaine Alters Subsequent Cocaine-induced Increase of Extracellular Dopamine in the Medial Prefrontal Cortex 1. , 281(1), pp.54–61.
- Sorkina, T. y *col.*, 2005. Constitutive and protein kinase C-induced internalization of the dopamine transporter is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(2), pp.157–70.

- Sorra, K.E. y Harris, K.M., 2000. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10(5), pp.501–11.
- Sotelo, C., 1990. Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *The Journal of experimental biology*, 153, pp.225–49.
- Spacek, J. y Harris, K.M., 1997. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(1), pp.190–203.
- Spanagel, R. y Weiss, F., 1999. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends in Neurosciences*, 22(11), pp.521–527.
- Steinkellner, T. y col., 2014. In Vivo Amphetamine Action is Contingent on α CaMKII. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(11), pp.2681–93.
- Stoppini, L., Buchs, P. a y Muller, D., 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods*, 37(2), pp.173–82.
- Sulzer, D., 2011. How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron*, 69(4), pp.628–49.
- Sulzer, D. y col., 2005. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Progress in neurobiology*, 75(6), pp.406–33.
- Sun, K.-H. y col., 2011. Glutathione S transferase P1 is a critical regulator of Cdk5 kinase activity. *Journal of neurochemistry*, 118(5), pp.902–14.
- Sundstrom, L. y col., 2005. Organotypic cultures as tools for functional screening in the CNS. *Drug discovery today*, 10(14), pp.993–1000.
- Sung, J.Y. y col., 2008. WAVE1 controls neuronal activity-induced mitochondrial distribution in dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), pp.3112–6.
- Surmeier, D.J. y col., 2007. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in neurosciences*, 30(5), pp.228–35.
- Takahashi, S. y col., 2005. Increased activity of cyclin-dependent kinase 5 leads to attenuation of cocaine-mediated dopamine signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), pp.1737–42.
- Tashiro, a, Minden, a y Yuste, R., 2000. Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 10(10), pp.927–38.
- Tashiro, A. y Yuste, R., 2004. Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1

- and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Molecular and cellular neurosciences*, 26(3), pp.429–40.
- Thompson, A.M., Gosnell, B. a y Wagner, J.J., 2002. Enhancement of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine exposure. *Neuropharmacology*, 42(8), pp.1039–42.
- Thompson, A.M., Swant, J. y Wagner, J.J., 2005. Cocaine-induced modulation of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 49(2), pp.185–94.
- Toda, S. y *col.*, 2006. Cocaine increases actin cycling: effects in the reinstatement model of drug seeking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(5), pp.1579–87.
- Toda, S., Shen, H. y Kalivas, P.W., 2010. Inhibition of actin polymerization prevents cocaine-induced changes in spine morphology in the nucleus accumbens. *Neurotoxicity research*, 18(3-4), pp.410–5.
- Tokuoka, H. y *col.*, 2000. Brain-derived neurotrophic factor-induced phosphorylation of neurofilament-H subunit in primary cultures of embryo rat cortical neurons. *Journal of cell science*, 113 (Pt 6, pp.1059–68.
- Tomizawa, K. y *col.*, 2002. Cdk5/p35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(7), pp.2590–7.
- Torres, G.E., 2006. The dopamine transporter proteome. *Journal of neurochemistry*, 97 Suppl 1, pp.3–10.
- Totterdell, S. y Smith, A.D., Convergence of hippocampal and dopaminergic input onto identified neurons in the nucleus accumbens of the rat. *Journal of chemical neuroanatomy*, 2(5), pp.285–98.
- Tresguerres, J.A.F., 2005. *Fisiología humana 3rd ed.*, McGraw-Hill Interamericana.
- Tritsch, N.X. y Sabatini, B.L., 2012. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron*, 76(1), pp.33–50.
- Tsay, D. y Yuste, R., 2004. On the electrical function of dendritic spines. *Trends in neurosciences*, 27(2), pp.77–83.
- Tyler, W.J. y Pozzo-Miller, L., 2003. Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *The Journal of physiology*, 553(Pt 2), pp.497–509.
- Tyler, W.J. y Pozzo-Miller, L.D., 2001. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(12), pp.4249–58.

- Vanderschuren, L.J. y Kalivas, P.W., 2000. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology*, 151(2-3), pp.99–120.
- Verney, C. y col., 1985. Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Neuroscience*, 14(4), pp.1039–1052.
- Vezina, P., 2004. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 27(8), pp.827–39.
- Wegner, A., 1976. Head to tail polymerization of actin. *Journal of molecular biology*, 108(1), pp.139–50.
- Wegner, A.M. y col., 2008. N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *The Journal of biological chemistry*, 283(23), pp.15912–20.
- Witcher, M.R., Kirov, S.A. y Harris, K.M., 2007. Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia*, 55(1), pp.13–23.
- Wolf, M.E., 2002. Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. *Molecular interventions*, 2(3), pp.146–57.
- Wolf, M.E., 1998. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Progress in Neurobiology*, 54(6), pp.679–720.
- Xu, J. y col., 2011. Actin interaction and regulation of cyclin-dependent kinase 5/p35 complex activity. *Journal of neurochemistry*, 116(2), pp.192–204.
- Yamashita, N. y col., 2007. Regulation of spine development by semaphorin3A through cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of collapsin response mediator protein 1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(46), pp.12546–54.
- Yao, W.-D., Spealman, R.D. y Zhang, J., 2008. Dopaminergic signaling in dendritic spines. *Biochemical pharmacology*, 75(11), pp.2055–69.
- Yoshihara, Y., De Roo, M. y Muller, D., 2009. Dendritic spine formation and stabilization. *Current opinion in neurobiology*, 19(2), pp.146–53.
- Zahniser, N.R. y Sorkin, A., 2009. Trafficking of dopamine transporters in psychostimulant actions. *Seminars in cell y developmental biology*, 20(4), pp.411–7.
- Zhang, H. y col., 2005. A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(13), pp.3379–88.
- Zhang, H. y col., 2003. Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1. *The Journal of cell biology*, 161(1), pp.131–42.
- Zhang, J. y col., 2007. Inhibition of the dopamine D1 receptor signaling by PSD-95. *The*

- Journal of biological chemistry, 282(21), pp.15778–89.
- Zhang, S. *y col.*, 2008. Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(2), pp.415–24.
- Zhang, W. *y* Benson, D.L., 2001. Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(14), pp.5169–81.
- Zimmer, J. and G.B., 1984. Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. *J Comp Neurol*, 3, pp.432–446.
- Zito, K. *y col.*, 2004. Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton. *Neuron*, 44(2), pp.321–34.
- Ziv, I. *y col.*, 1994. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons — A possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 170(1), pp.136–140.
- Ziv, N.E. *y* Smith, S.J., 1996. Evidence for a Role of Dendritic Filopodia in Synaptogenesis and Spine Formation. *Neuron*, 17(1), pp.91–102.
- Zukerberg, L.R. *y col.*, 2000. Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron*, 26(3), pp.633–46.