



Participación del Sistema Encefalinérgico en la Adicción a Cocaína

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

Bioq. Bethania Mongi Bragato

Departamento de Farmacología

IFEC-CONICET

Universidad Nacional de Córdoba

2014

Comisión Asesora de Tesis

Dr. Carlos Arce

Dr. Daniel Mascó

Dra. Miriam Virgolini

Dra. Liliana Cancela

(Directora de Tesis)

Dra. Silvia Wikinski

(Evaluador Externo)

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

Durante la ejecución de este trabajo la autora fue becaria del CONICET (2009-2014), cumplimentó los cursos requeridos y se desempeñó como Profesor Asistente (Dedicación Simple) en el Departamento de Farmacología. Para su realización contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por: el CONICET, la Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT), el Ministerio Nacional de Ciencia y Tecnología (MINCyT) y el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT)

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento se extiende profunda e interminablemente hacia todas aquellas personas que están asociadas en mi mente a miles de pequeñas y grandes situaciones causales de todos advenimientos que tuvieron lugar en el curso de este trabajo de tesis. Particularmente, deseo agradecer:

A la Dra. Liliana Cancela por dirigir este estudio, por su comprensión en los momentos difíciles y su exigencia, la cual logró en mí una madurez personal y nivel académico los cuales nunca creí alcanzar.

A la Comisión Asesora de Tesis, por sus sugerencias y consejos. Especialmente al Dr. Daniel Mascó por su colaboración en los experimentos de BDNF/TrkB.

Al a la Dra. Silvia Wikinski por aceptar evaluar este trabajo de tesis.

Al grupo de la Dra. Cancela: Flavia, Amparo, Constanza, Alejandra, Laurita, Pauli y Andrea por su ayuda en los experimentos y consejos, por compartir estos años conmigo.

A la Dra. Beatriz Caputto por albergar gentilmente en su excelente bioterio a los ratones KO.

A la Dra. Daniela Bussolino por sus enseñanzas sobre el cuidado, reproducción y manipulación de los ratones KO.

A la Dra. Gabriela Paglini por brindar el lugar para realizar los experimentos conductuales en el Instituto Mercedes y Martín Ferreyra.

A Estela Salde y Lorena Mercado por su inigualable y excelente soporte técnico en los experimentos y genotipificación de los ratones WT y KO.

A los Profesores, compañeros y personal administrativo del IFEC-CONICET por brindar mucho más que un lugar de trabajo.

A la Facultad de Ciencias Químicas representada por su cuerpo de profesionales de excelencia que generan e imparten y conocimiento permitiendo la realización de las carreras de grado y postgrado.

Finalmente (y los más importantes):

A mis padres Teresita y Rodolfo, por su amor incondicional, su ayuda permanente y desinteresada, porque son mi guía y ejemplo.

A mi hermana Mariana por estar siempre a mi lado y atender cada una de mis ocurrencias, por su alegría y cariño interminables.

A mi nonnos Teresa y Biagio, por su afecto, por sus sabias enseñanzas sobre la vida las cuales llevo guardadas en mi corazón.

A Emi y Bian por su amistad e inolvidables momentos compartidos, por cuidar a Genaro mientras escribía muchas de las páginas de esta tesis.

A German, mi compañero de viaje, por hacer que mire todo desde otra perspectiva y piense diferente, por ser mi motivación, por su profundo amor.

A Olivia, por tantas sesiones de psicoterapia gratuita que subsanaron con creces todo el estrés de este trabajo.

A Genaro, por darle alegría a mi vida.

A mi familia, por todo lo que tuvieron que hacer (y deshacer), leer, pensar, viajar (y cuanto!), llorar, sufrir y rezar para que pueda realizar y finalizar este estudio. Todo su esfuerzo no fue en vano: esta tesis es suya.

ABREVIATURAS

AC: Adenilatociclasa

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxiazolpropiónico

ATV: Área Tegmental Ventral

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BNST: Núcleo del lecho de la estria terminal:

CaMKII: Calmodulin-quinasa II

CPf: Corteza Prefrontal

CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico

CTAP: D-Phe-cyc(Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen)-Thr-NH₂

DARPP-32: Fosfo-proteína regulada por dopamina y AMPc de 32 kDa

DAT: Transportador de dopamina

DOPA-decarboxilasa: Decarboxilasa de aminoácidos aromáticos

ERK: Proteín-quinasa regulada por señales extracelulares

IP₃: Inositol 3 fosfato

KO: Animales que carecen del gen que codifica para la proencefalina o *knockout*

L-DOPA: L-dihidroxifenilalanina

Leu-encefalina: Leucina-encefalina

MAO: Monoaminoxidasa

MAPK: Proteínas-quinasas activadas por mitógenos

Met-encefalina: Metionina-encefalina

mGluR 2/3: Receptores glutamatérgicos metabotrópicos del grupo II

MSK1: Proteín-quinasa activada por mitógenos y estrés

MSN: Neuronas espinosas medianas

NAc: Núcleo Accumbens

NMDA: N-metil D-aspartato

NX: Naloxone

pCREB: Proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico fosforilada

pERK: Proteín-quinasa regulada por señales extracelulares fosforilada

Pi3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PKA: Proteín-quinasa A

PLC: Fosfolipasa C

POMC: Pro-opiomelanocortina

pTrkB: Receptor de tipo tirosín-quinasa B fosforilado

RSK: Proteín-quinasa ribosomal S6

SNC: Sistema nervioso central

SOE: Sistema opioide endógeno

TH: Tirosina hidroxilasa

TrkB: Receptor de tipo tirosín-quinasa B

WT: Animales de genotipo salvaje o *wild type*

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
ADICCIÓN A DROGAS: Marco conceptual	5
SISTEMA DOPAMINÉRGICO MESOCÓRTICOLÍMBICO.....	6
Síntesis, almacenamiento y liberación de dopamina.....	7
Psicoestimulantes: cocaína.....	8
Vías dopaminérgicas centrales.....	9
El circuito de la motivación.....	10
- Organización estructural y celular del núcleo accumbens y cuerpo estriado dorsal.....	12
Participación del circuito de la motivación en los efectos estimulantes y de recompensa de las drogas de abuso	14
EL SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO (SOE)	15
Receptores opioides	15
Péptidos opioides endógenos.....	17
Proencefalina y péptidos derivados: sistema encefalinérgico.....	19
- Síntesis, almacenamiento y liberación	19
- Localización.....	21
- Influencia de encefalina en la neurotransmisión mesocorticolímbica	22
SENSIBILIZACIÓN CONDUCTUAL A PSICOESTIMULANTES.....	25
Iniciación de la sensibilización conductual a cocaína: eventos moleculares y neuroquímicos en ATV.....	26
Expresión de la sensibilización conductual a cocaína.....	28
Eventos neuroquímicos asociados a la sensibilización conductual inducida por cocaína.....	29
Eventos moleculares asociados a la sensibilización conductual inducida por cocaína.....	29
La proteína-quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y su rol en la sensibilización conductual inducida por cocaína	30
-La cascada ERK.....	30
-Activación de ERK como componente intracelular clave en las neuroadaptaciones asociadas a la sensibilización a cocaína.....	31
La proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico (CREB)y su rol en la sensibilización	

conductual inducida por cocaína.....	34
-El factor de trascrición CREB.....	34
-La activación de CREB y su rol en cambios a largo término asociados a la sensibilización inducida por cocaína.....	35
Alteraciones en la expresión del receptor glutamatérgico AMPA y su participación en la sensibilización conductual inducida por cocaína.....	35
Alteraciones en los niveles del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y su rol en la sensibilización conductual inducida por cocaína.....	37
-El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).....	37
-Participación del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en la sensibilización conductual inducida por cocaína.....	37
Participación del SOE en la sensibilización a conductual a cocaína: rol de encefalina y sus receptores.....	39
OBJETIVOS.....	41
HIPÓTESIS.....	42
Objetivo General.....	42
Objetivos específicos.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
Animales.....	47
Drogas	51
Tratamientos	51
ESTUDIOS CONDUCTUALES	53
Registro de actividad locomotora	53
ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS	53
Fundamento de la técnica de microdiálisis <i>in vivo</i>	53
Construcción de las sondas (<i>probes</i>) para microdiálisis.....	54
Cirugías	55
Microdiálisis <i>in vivo</i>	55
Determinación de dopamina por cromatografía líquida de alta performance (HPLC).....	56
Histología.....	57
ESTUDIOS MOLECULARES.....	57

Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	57
Preparación de homogenatos cerebrales y fraccionamiento sub-celular.....	60
Biotinilación de proteínas en superficie celular: fundamento	62
Inmunotransferencia de proteínas.....	65
Análisis estadístico.....	66
RESULTADOS	67
Efecto de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización conductual sobre los niveles de met-enkefalina en áreas del circuito mesocotilímbico relevantes para la expresión del fenómeno.....	68
Participación del sistema encefalinérgico en el fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína.....	70
Participación del sistema encefalinérgico en los cambios pre-sinápticos asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína: liberación de dopamina en NAc y expresión del transportador de dopamina (DAT).....	73
-Participación del sistema encefalinérgico en la sensibilización al efecto estimulante de cocaína sobre la liberación de dopamina en el Nac.....	73
-Niveles del transportador de dopamina (DAT) en el NAc y estriado dorsal de ratones WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización.....	76
Participación del sistema encefalinérgico en los eventos moleculares asociados al fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína	78
-Niveles de BDNF/pTrkB en el NAc y estriado dorsal de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización	78
-Niveles de BDNF en en la CPf de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización	82
-Niveles de pERK2 en el NAc y estriado dorsal proveniente de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización.....	82
-Niveles de pERK2 en el NAc, estriado dorsal y CPf de animales WT y KO administrados con una dosis aguda de cocaína.....	83
-Niveles de pERK2/pCREB en fracciones nucleares del NAc y estriado dorsal proveniente de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización	86
-Niveles de expresión del receptor AMPA (subunidad GluR1) en superficie celular del NAc y estriado dorsal de animales WT y KO luego de un tratamiento con cocaína que induce sensibilización	88
Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el fenómeno de sensibilización a cocaína y eventos	

moleculares asociados	90
-Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el desarrollo del fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína	91
-Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el desarrollo de los eventos moleculares asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína	93
° Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el incremento en los niveles de BDNF/pTrkB a nivel de NAc asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína.....	94
° Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el incremento en los niveles de BDNF a nivel del ATV y CPf asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína.....	96
° Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el incremento en los niveles de pERK2 y pCREB a nivel del NAc y estriado dorsal asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína	98
° Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el incremento en la expresión de receptores AMPA (subunidad GluR1) en la superficie celular del NAc y estriado dorsal asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína.....	99
DISCUSIÓN	102
Activación del sistema encefalinérgico por cocaína	103
El sistema encefalinérgico facilita el desarrollo de la sensibilización respecto al efecto estimulante motor y la liberación de dopamina en el NAc inducido por cocaína.....	105
El sistema encefalinérgico facilita el desarrollo de las neuroadaptaciones moleculares asociadas al fenómeno de sensibilización a cocaína.....	109
El pre-tratamiento con NX previene el desarrollo del fenómeno de sensibilización inducido por cocaína y eventos moleculares asociados a nivel del Nac.....	116
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

RESUMEN

RESUMEN

La adicción a las drogas puede ser vista como el resultado de una serie de eventos neuronales que llevan al individuo desde el uso voluntario y ocasional de una droga hasta a la pérdida del control sobre este comportamiento, llegando a la compulsión por su uso (Everitt y col., 2008). La hipótesis central en el campo de la adicción es que la exposición a una amplia variedad de estímulos ambientales, interactuando con la constitución genética de un individuo, determinan el desarrollo de la adicción. En relación a esto, se cree que las alteraciones en los patrones de expresión de genes inducidos por una droga a lo largo de los sistemas de recompensa del cerebro son un mecanismo potencial para mediar la adicción a las misma y son responsables de las alteraciones neuroquímicas y moleculares que caracterizan a la adicción (Nestler y col., 2001). En este sentido, el impacto de cocaína en el circuito de la motivación determina los cambios neuroplásticos relacionados con el consumo de la droga, dichos cambios subyacen el fenómeno de sensibilización inducido por cocaína y otras conductas asociadas a la adicción.

En relación a esto, se sabe que tanto en los humanos como en animales de experimentación, la administración repetida e intermitente de drogas psicoestimulantes, como anfetamina y cocaína, produce respuestas conductuales progresivamente mayores a las observadas inicialmente, aún después de semanas o meses luego de la última administración. Este incremento en los efectos conductuales de los psicoestimulantes se conoce como sensibilización conductual. Este fenómeno es un reflejo de la sensibilización incentivo-motivacional propuesta para explicar la compulsión a la búsqueda y administración de la droga que caracteriza al proceso adictivo.

Determinados sistemas neuroquímicos, el sistema dopaminérgico, glutamatérgico, así como también el sistema opioide endógeno (SOE) y determinados factores tróficos, ocupan una posición central dentro del circuito de la motivación y han sido asociados también con el desarrollo y/o la expresión de la sensibilización (Kalivas y Stewart, 1991; Pierce y Kalivas, 1997). En este sentido, si bien hay evidencia farmacológica que involucra la participación de los receptores opioides en el desarrollo y la expresión de la sensibilización conductual a cocaína, los estudios que utilizan herramientas genéticas (ratones *knockout* para los receptores μ -opioides) no han sido concluyentes para establecer la influencia de estos receptores en el fenómeno de sensibilización (Yooy col., 2012).

Además, no se ha descrito cuál de los péptidos opioides endógenos participaría en la sensibilización inducida por cocaína. En relación a esto, determinados estudios han demostrado que el sistema de encefalina y péptidos derivados modula positivamente la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica dentro del circuito de la motivación, y sus niveles se encuentran incrementados luego de un tratamiento crónico con cocaína en áreas cerebrales relevantes para la expresión del fenómeno de sensibilización a cocaína, existiendo una posible influencia ejercida por encefalina sobre dicho proceso.

Es por esto que utilizando ratones KO para el gen de la proencefalina se estudió la participación del sistema encefalinérgico en los efectos inducidos por cocaína sobre el sistema nervioso central (SNC), evaluando su rol en la sensibilización a los efectos estimulantes sobre aspectos conductuales y las neuroadaptaciones bioquímicas y moleculares en áreas del circuito mesocorticolímbico asociadas al fenómeno. Ratones de genotipo salvaje (WT) y knockout (KO) para proencefalina fueron sometidos a un tratamiento crónico con cocaína (9x15mg/kg i.p.) para inducir sensibilización. En otro set de experimentos, se administró naloxone (NX) (1 mg/kg s.c.) en ratones de la cepa C57BL/6 antes de cada inyección de cocaína durante la fase de tratamiento. Todos los animales recibieron un desafío con cocaína (7,5mg/kg i.p.) transcurridos 15 y 21 días desde el inicio del tratamiento crónico con la droga para evaluar la expresión de la sensibilización al efecto estimulante motor inducido por cocaína. El día 21, se realizaron estudios de microdiálisis *in vivo* para determinar los niveles extracelulares de dopamina, ensayos de inmunotransferencia de proteínas para determinar los niveles de expresión de la subunidad GluR1 del receptor AMPA, fosforilación de ERK2 (pERK2), CREB (pCREB), TrkB (pTrkB) y experimentos de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica para medir niveles del factor trófico derivado de cerebro (BDNF) y metionina-encefalina (met-encefalina), respectivamente, en áreas del cerebro relevantes para la sensibilización provenientes de los animales KO y WT y/o pre tratados con NX o vehículo.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demostraron que la exposición crónica a cocaína produce importantes incrementos en los niveles de met-encefalina en áreas del circuito mesocorticolímbico relevantes para la expresión del fenómeno de sensibilización y que la ausencia del gen que codifica para dicho neuropéptido resulta en una falla en la expresión de la sensibilización a las propiedades estimulantes de cocaína

sobre la actividad locomotora y en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (NAc). A nivel molecular, suprime las neuroadaptaciones clave asociadas al fenómeno tales como el aumento en la señalización BDNF/TrkB, la fosforilación de ERK2/CREB y la expresión del receptor AMPA. Consistentemente, se observó una completa supresión de la plasticidad conductual y neuronal inducida por la cocaína después de pre-tratamiento con NX.

Los resultados presentados en este trabajo de tesis demuestran por primera vez que el sistema de proencefalina y péptidos derivados es esencial en el desarrollo de las neuroadaptaciones fundamentales subyacentes a la sensibilización conductual inducida por cocaína y enfatizan la noción de que los genes que son alterados tras el consumo de una droga dentro del circuito de la motivación estarían involucrados en el desarrollo de dichos cambios neuroquímicos y moleculares que confieren estabilidad a los trastornos conductuales que caracterizan al proceso adictivo. Además, estas observaciones proveen la primera evidencia sobre los mecanismos neurobiológicos que explican la efectividad de los antagonistas opiáceos en el tratamiento de la adicción a cocaína apoyando su utilidad como terapia para este trastorno (Schmitz y col., 2009; Comer y col., 2013; Mooney y col., 2013)

INTRODUCCIÓN

ADICCIÓN A DROGAS: Marco conceptual

La adicción a drogas es uno de los problemas de salud más severos que enfrentan numerosos países en el mundo. Los aspectos más desafiantes en el tratamiento de la adicción son el deseo compulsivo por consumir la droga y la recaída, especialmente en vista del hecho de que, actualmente, no existe un tratamiento eficaz para este trastorno, lo que requiere de nuevos enfoques terapéuticos sobre la base de la comprensión de la neurobiología de la adicción a las drogas.

La adicción a drogas se define como un desorden crónico recurrente caracterizado por la compulsión a la búsqueda y administración de la droga, la pérdida del control en la limitación de la autoadministración y la emergencia del estado emocional negativo que sobreviene cuando el acceso a la droga está imposibilitado (Koob y Le Moal, 2008). La adicción a las drogas puede ser vista como el resultado de una serie de eventos neuronales que llevan al individuo desde el uso voluntario y ocasional de una droga hasta a la pérdida del control sobre este comportamiento, llegando a la compulsión por su uso (Everitt y col., 2008).

Aunque muchos individuos están expuestos a drogas de abuso, sólo una parte de ellos experimenta la pérdida del control sobre su consumo y la compulsión por la búsqueda y administración de la misma, que definen al estado de adicción. La entrada en este estado está fuertemente influenciada tanto por la constitución genética individual y por el contexto psicológico y social en el cual ocurre la exposición a la droga. La hipótesis central en el campo de la adicción es que la exposición a una amplia variedad de estímulos ambientales, interactuando con la constitución genética de un individuo, determina la respuesta inicial a las drogas de abuso, mientras que también los factores genéticos y ambientales, conjuntamente con las neuroadaptaciones cerebrales que resultan de la exposición repetida a la droga, juegan en su conjunto un rol clave en el desarrollo de la adicción (Nestler, 2004; 2001; Vink y col., 2005; Jean Bierut, 2011). Es por esto que la constitución genética de un individuo resulta determinante no solo en la respuesta inicial ante la exposición a una droga sino que también podría establecer la transición desde el uso recreacional de la misma al estado de adicción, y explicaría también porqué determinados factores ambientales (ej.

estrés) impactan de una u otra manera en el individuo para incrementar el riesgo a desarrollar adicción.

Los genes específicos que confieren la susceptibilidad a la adicción a cocaína u otras drogas de abuso en los seres humanos aún no se conocen con exactitud, aunque determinados autores postulan que estos genes son aquellos afectados tras el consumo de la droga (ej.: genes que codifican para determinados factores de transcripción y péptidos opioides) (Nestler y col., 2008; McClung y Nestler, 2008). Se cree que las alteraciones en los patrones de expresión de genes inducidos por una droga a lo largo de los sistemas de recompensa del cerebro son un mecanismo potencial para mediar la adicción a la misma y son responsables de las alteraciones neuroquímicas y moleculares que caracterizan a la adicción (Nestler, 2001). En este sentido, en los últimos años numerosas líneas de investigación sugieren que la exposición crónica a las drogas de abuso causa adaptaciones bioquímicas y moleculares a largo término que resultan en cambios neuroplásticos perdurables en los circuitos cerebrales. Dichas neuroadaptaciones sentarían las bases neurobiológicas para explicar la estabilidad de los trastornos conductuales que caracterizan al proceso adictivo, tales como el consumo compulsivo de la droga y la recaída después de largos períodos de abstinencia (Nestler y col., 1997; White y Kalivas, 1998). La atención se ha centrado principalmente en los efectos de diversas drogas de abuso en áreas corticales y subcorticales, incluyendo el circuito dopaminérgico mesolímbico y mesocortical. Particularmente, el papel de los sistemas de neurotransmisión glutamatérgico y dopaminérgico, así como su interacción dentro de dichos circuitos, han recibido especial atención en la determinación los cambios neuroplásticos relacionados con el consumo de cocaína. A nivel molecular, se ha demostrado que la activación de los sistemas glutamatérgicos y dopaminérgicos tras la administración repetida de cocaína, afectan vías de señalización intracelulares específicas, producen alteraciones en la expresión de receptores y cambios en la expresión de genes dentro de los circuitos neuronales que conforman, lo que conduce a la sensibilización de los efectos de la droga (Robinson y Berridge, 1993) y a otras alteraciones conductuales observadas en la adicción.

SISTEMA DOPAMINÉRGICO MESOCORTICOLÍMBICO

Síntesis, almacenamiento y liberación de dopamina

La dopamina se origina a partir del aminoácido L-tirosina. La enzima tirosina hidroxilasa (TH) es la encargada de transformar este aminoácido en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), siendo éste el paso limitante de la síntesis de catecolaminas. Por acción de la enzima decarboxilasa de aminoácidos aromáticos (DOPA-decarboxilasa), L-DOPA es transformada en dopamina (Figura 1A).

En la neurona, la actividad de la enzima TH está regulada por los niveles de catecolaminas presentes (inhibición por producto final), por la disponibilidad del cofactor tetra-hidrobiopterina y por la activación de los receptores pre-sinápticos tipo D2. Una vez sintetizada, la dopamina es incorporada a las vesículas a través de un transportador de alta afinidad, denominado transportador vesicular de monoaminas (VMAT2), que funciona acoplado a una bomba de protones dependiente de la hidrólisis de ATP. Ante la llegada de un potencial de acción a la terminal pre-sináptica, la entrada de Ca^{2+} promueve la fusión de las vesículas con la membrana sináptica, provocando la descarga del neurotransmisor al espacio sináptico. Luego de su liberación, existen varios mecanismos que se encargan de eliminar el neurotransmisor de la hendidura sináptica. El transportador de dopamina (DAT) presente en la neurona pre-sináptica, posee un rol fisiológico clave en la inactivación y reciclado de la dopamina liberada en la hendidura sináptica, a través del transporte activo de este neurotransmisor desde la hendidura sináptica hacia la neurona pre-sináptica. El DAT incorpora la dopamina del espacio extracelular al citosol utilizando energía de un gradiente iónico de Na^+/Cl^- (Kahlig y Galli, 2003). Una vez recaptada, la dopamina puede ser almacenada en las vesículas para su reutilización, o degradada por la enzima monoaminooxidasa (MAO).

La dopamina activa a dos familias de receptores acoplados a proteínas G: los receptores dopaminérgicos del grupo D1 (acoplado a proteína G excitatoria) y receptores dopaminérgicos del grupo D2 (acoplado a proteína G inhibitoria) (Figura 1). La familia de receptores D1 está compuesta por los subtipos de receptores D1 y D5, mientras que la familia D2 está compuesta por los subtipos D2, D3 y D4. Los receptores D1 y D2 son los más abundantes en el cuerpo estriado dorsal y ventral. Los receptores D1 están acoplados a proteína excitatoria (G_{olf} o G_s). Tras su activación por dopamina, se produce una estimulación de enzima adenilato ciclasa (AC) con un incremento en los niveles de cAMP intracelular. Estos receptores se ubican en la post-sinápsis. Los receptores D2 inhiben la

actividad de la enzima AC por medio de la proteína inhibitoria (G_i o G_o) provocando la apertura de canales de K^+ , inactivando canales de Ca^{++} dependientes de voltaje y estimulando a la enzima fosfolipasa C (PLC). Existen a su vez dos variantes de estos receptores denominados $D2_s$, que son autoreceptores y $D2_i$ que se ubican post-sinápticamente.

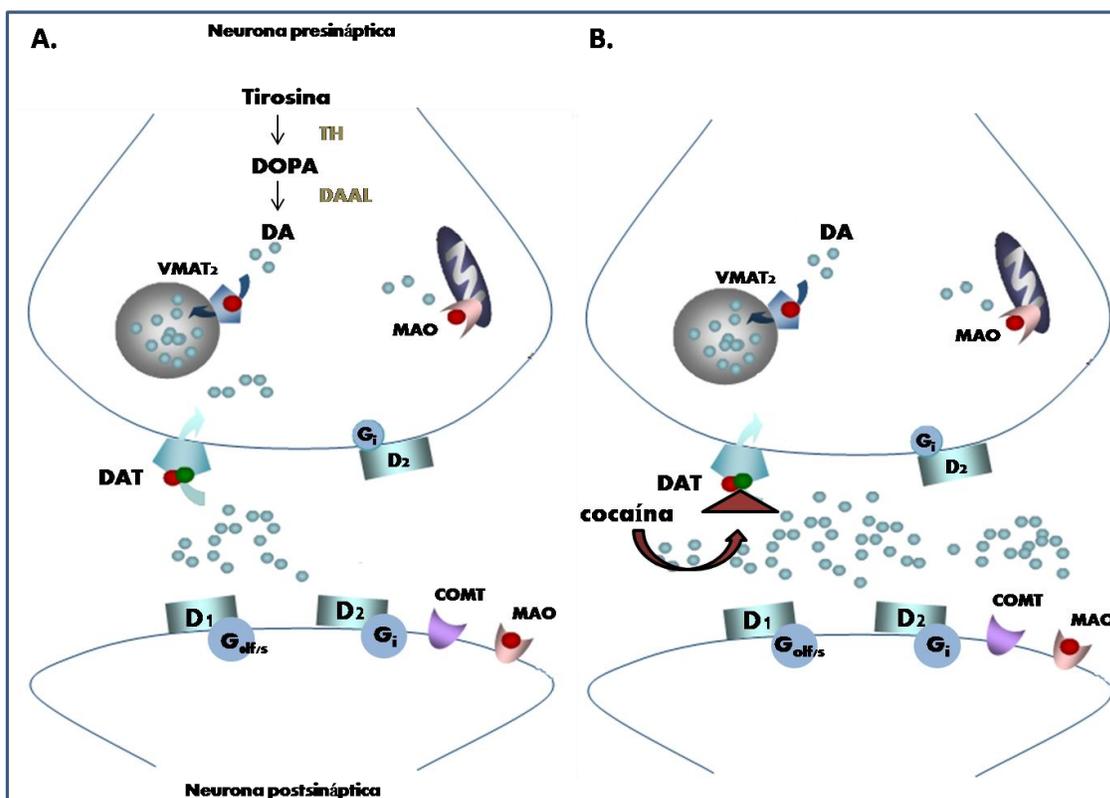


Figura 1 A Terminal dopaminérgica mostrando la síntesis, almacenamiento, liberación y recaptación de dopamina. En la figura también se ilustran las dos familias de receptores dopaminérgicos (D1 y D2) B Terminal dopaminérgica mostrando el sitio de acción de cocaína. DA: dopamina. TH: Tirosina-hidroxilasa. DAAL: decarboxilasa de aminoácidos aromáticos tipo L. DAT: Transportador de dopamina. VMAT-2: Transportador vesicular de monoaminas. MAO: monoaminoxidasa. COMT: catecol-o-metil transferasa.

Psicoestimulantes: cocaína

Cocaína es un alcaloide que se extrae de las hojas de la planta de coca (*Erythroxylon coca*). Dichas hojas poseen 14 alcaloides naturales dentro de los cuales el más conocido es la cocaína. La cocaína se comporta como una amina simpático-mimética de acción indirecta, es decir, es capaz de remedar las acciones de las catecolaminas no actuando

directamente sobre los receptores adrenérgicos o dopaminérgicos, sino aumentando la disponibilidad del neurotransmisor en la hendidura sináptica. Cocaína es un potente inhibidor de la recaptación de dopamina de la terminal nerviosa ya que bloquea a su transportador (DAT), dificultando su reingreso a la terminal pre-sináptica y produciendo así un aumento en su disponibilidad dentro de la hendidura sináptica (Figura 1B). De esta manera aumenta considerablemente la transmisión dopaminérgica, ya que la dopamina liberada al no ser recaptada continúa estimulando a la neurona post-sináptica al interactuar con sus receptores específicos. En estudios realizados con ratones genéticamente deficientes en este transportador, se observó que la administración de cocaína no produce efectos conductuales ni bioquímicos. Por lo tanto, el DAT es necesario para la acción farmacológica de la cocaína ya que al bloquearlo, uniéndose de manera específica y con gran afinidad, inhibe la recaptación de dopamina.

Dado que las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo también liberan dopamina de sus dendritas (Cheramy y col., 1981; Beckstead y col., 2004) el bloqueo del DAT provoca un aumento de dopamina en el Area Tegmental Ventral (ATV), así como en el Núcleo Accumbens (NAc) y la Corteza Prefrontal (CPf). Los psicoestimulantes también disminuyen la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas a través de la auto-inhibición mediada por el receptor dopaminérgico D2 (Chen y Reith, 1994). Debido a que el bloqueo de la recaptación de dopamina supera la consecuente reducción en la frecuencia de disparo de las células dopaminérgicas, el resultado neto es un incremento en los niveles de dopamina. Esto genera un marcado efecto estimulante psicomotor el cual se traduce en euforia, aumento del estado de alerta y vigilia y actividad motora junto con una estimulación del sistema nervioso autónomo simpático.

Vías dopaminérgicas centrales

Las neuronas dopaminérgicas centrales están organizadas dentro tres núcleos principales: el ATV, la sustancia nigra y el núcleo arcuato. Los cuerpos neuronales que integran estos núcleos dan origen a fibras que conforman dos vías principales, la mesocorticolímbica y la nigroestriatal que nacen en el cerebro medio y proyectan hacia el cerebro anterior y las áreas corticales, y un tracto menor, el tuberoinfundibular, de proyecciones más cortas (Cooper y col., 1996).

La vía mesocorticolímbica se origina en el ATV del cerebro medio, y luego se divide dando la vía mesocortical, que proyecta hacia CPf, corteza cingulata y corteza entorrinal, y la vía mesolímbica, que proyecta rostralmente hacia NAc, tubérculo olfatorio, corteza piriforme, amígdala e hipotálamo lateral (Le Moal y Simon, 1991). A su vez, CPf, amígdala, tálamo dorsomedial e hipocampo envían proyecciones al NAc, y éste a su vez a ATV y al núcleo ventral pálido (Figura 2, en azul). En su conjunto, la vía mesocorticolímbica está relacionada con procesos emocionales y cognitivos, y con el sistema de recompensa (Koob y col., 1994).

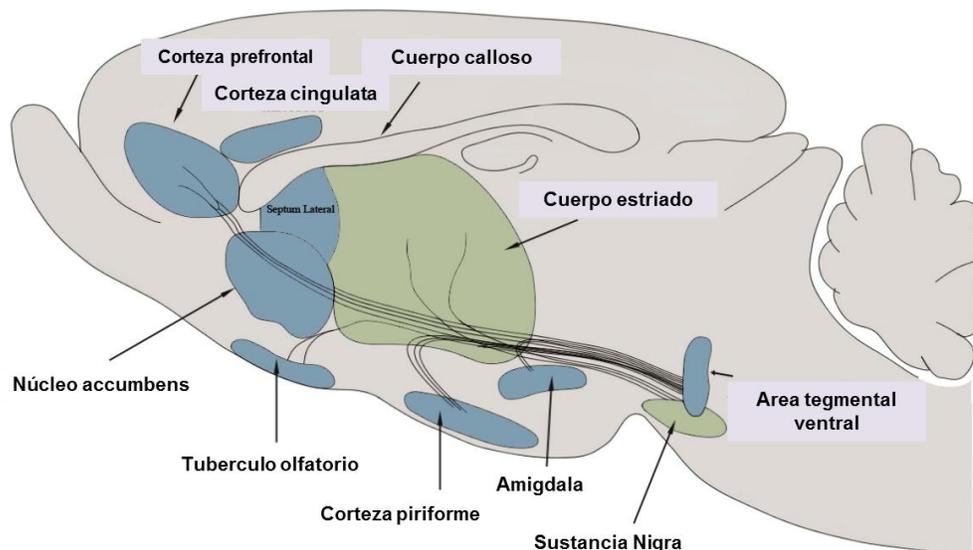


Figura 2. Vía dopaminérgica mesocorticolímbica (en azul). Vía dopaminérgica nigroestriatal (en verde)

La vía nigroestriatal está formada por neuronas que proyectan desde la sustancia nigra, cercana al ATV, hacia el estriado dorsal, cercano al NAc (Figura 2, en verde). Esta vía tiene un rol fundamental en la ejecución de conductas motoras (Swerdlow y col., 1986).

Finalmente, el tracto tuberoinfundibular es un sistema neuroendócrino compuesto por neuronas dopaminérgicas más cortas, ubicadas en el núcleo arcuato del hipotálamo, que proyectan hacia el lóbulo intermedio de la hipófisis y el final de la eminencia media. La liberación de dopamina en la hipófisis anterior inhibe la síntesis y liberación de prolactina y estimula la liberación de la hormona de crecimiento. La disrupción de esta vía puede conducir a trastornos neuroendócrinos.

El circuito de la motivación

Las vías mesocorticolímbica y nigroestriatal están relacionadas entre sí en un circuito anatómico y funcional permitiendo un flujo discreto de la información desde el sistema límbico hacia los sistemas motores piramidal y extrapiramidal (Figura 3).

Los núcleos del sistema límbico incluyen la amígdala, el hipocampo, y la corteza medial prefrontal los cuales envían proyecciones glutamatérgicas hacia el NAc, estimulando todos los subtipos neuronales de esta área cerebral (Pierce y Kalivas, 1997a; Vanderschuren y Kalivas, 2000). Las neuronas GABAérgicas del NAc envían proyecciones al núcleo ventral pálido, ATV y sustancia nigra. Tanto ATV como sustancia nigra inervan el tálamo dorsal medial y éste último envía proyecciones glutamatérgicas hacia CPf cerrando el circuito. Además ATV envía proyecciones dopaminérgicas hacia NAc, amígdala, CPf, núcleo ventral pálido y el núcleo del lecho de la estria terminal (BNST).

Este circuito neuronal conocido como “circuito de la motivación” tiene un papel consecuente en la traducción de estímulos biológicamente relevantes en respuestas conductuales adaptativas y se ha demostrado que los núcleos interconectados que lo conforman actúan en conjunto para permitir la expresión de las respuestas conductuales a estímulos farmacológicos o ambientales. Así, el sistema límbico está involucrado en los fenómenos de motivación y emoción, y el circuito motor en los fenómenos de activación y modulación de respuestas motoras a estímulos que satisfacen necesidades homeostáticas internas (Koob y Le Moal, 2008). Ambas vías dopaminérgicas (mesocorticolímbica y nigroestriatal) que conforman el circuito han sido asociadas con la función motora y la respuesta de iniciación, y son responsables de las acciones psicoestimulantes de cocaína.

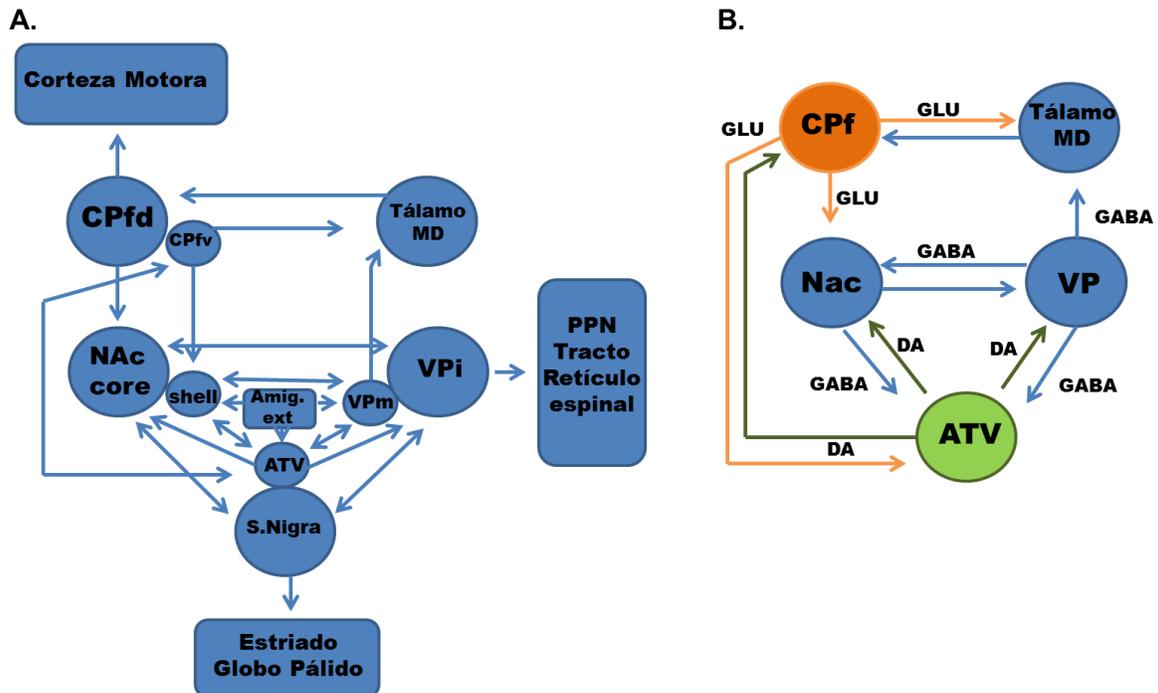


Figura 3. El circuito de la motivación. El panel **A** muestra la topografía de las interconexiones entre los subnúcleos del circuito e ilustra cómo la información puede progresar desde el sistema límbico a los sistemas motores piramidales y extra-piramidales. El panel **B** ilustra una versión simplificada del circuito y muestra el neurotransmisor de las principales proyecciones. DA, dopamina; GABA, g-aminobutírico; GLU, glutamato; Tálamo MD, tálamo dorsal medial; S Nigra, sustancia nigra; VP, pálido ventral; ATV, área tegmental ventral; CPfv, corteza prefrontal ventral; CPfd, corteza prefrontal dorsal.

Organización estructural y celular del núcleo accumbens y estriado dorsal.

Dentro del circuito de la motivación, el NAc (estriado ventral) es considerado una interface que modula el paso de información entre los distintos núcleos cerebrales (Koob y Le Moal, 1997; Wolf, 2002). Se divide en dos subregiones denominadas NAc core, que rodea la comisura anterior y el NAc Shell que es la región ventral y medial al core. El NAc Shell, cercano a la amígdala extendida, estaría involucrado en la regulación de la motivación y el reforzamiento (Di Chiara e Imperato., 1998) mientras que el NAc core, relacionado anatómicamente y funcionalmente al estriado dorsal, estaría involucrado en la integración sensorio-motora. Así en el NAc ocurriría la transición de la información emocional a la ejecución de una respuesta motora.

El NAc se compone de múltiples tipos de células neuronales (Figura 4). El 95 % de las neuronas corresponden a neuronas espinosas medianas (MSN) GABAérgicas, que se

diferencian entre aquellas que expresan receptores dopaminérgicos del tipo D1 junto con dinorfina y sustancia P, y las que expresan receptores dopaminérgicos D2 junto con encefalina. Cerca del 1-2 % de las neuronas del NAc son interneuronas colinérgicas, y un número similar corresponde a interneuronas GABAérgicas. Las aferencias excitatorias glutamatérgicas que llegan al NAc son moduladas por aferentes dopaminérgicas provenientes del ATV, y por los péptidos opioides endógenos que son expresados a nivel local y también liberados por aferencias neuronales provenientes de otras áreas cerebrales. Los cannabinoides también tienen un papel regulador dentro del NAc, actuando principalmente a nivel local por inhibición de la funcionalidad de las sinapsis glutamatérgicas (Robison y Nestler, 2011).

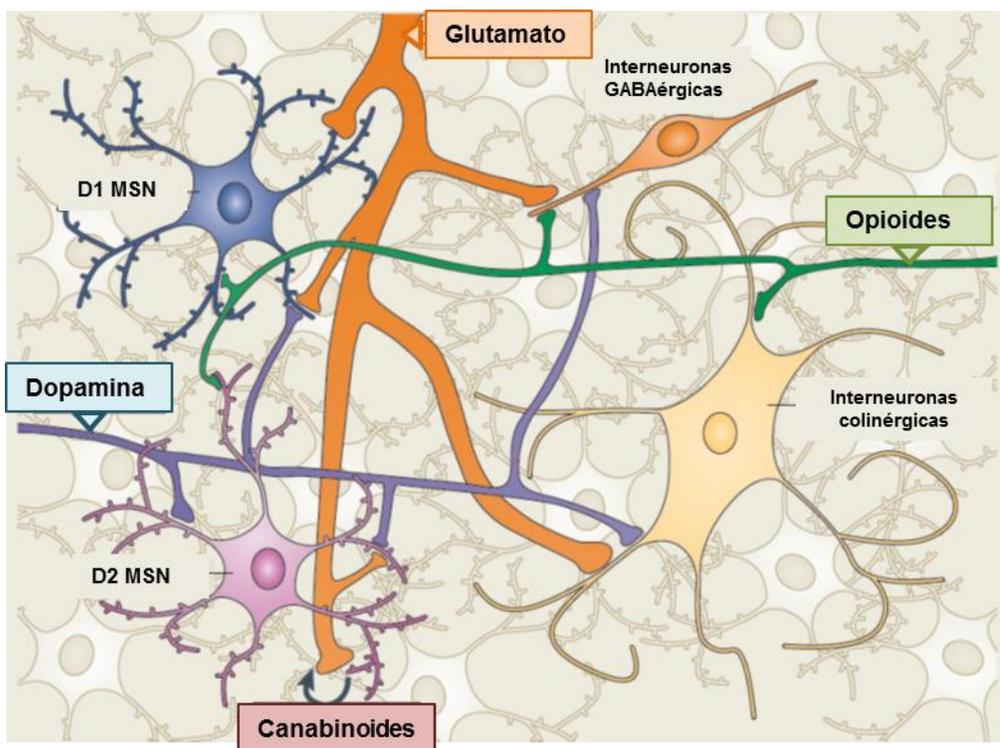


Figura 4. Organización celular dentro del núcleo accumbens. (Modificado de Robison y Nestler, 2011)

A diferencia de la región ventral del estriado, la zona dorsal es un área crítica para la integración y la regulación de la actividad motora y las funciones cognitivas que están mediadas por interacciones entre aferentes dopaminérgicas (provenientes de la SN), glutamatérgicas corticales y neuronas intrínsecas que residen en parches (estriosomas) o compartimentos de la matriz estriatal (Gerfen, 1985; Parent y Hazrati, 1995). Similar al

NAc, el estriado dorsal está compuesto por MSN, así como interneuronas colinérgicas y GABAérgicas, que expresan diferentes neuromoduladores y receptores (Angulo y McEwen, 1994; Holt y col., 1997).

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

Evolutivamente el circuito de la motivación ha asegurado la supervivencia al asociar funciones vitales con un estado emocional positivo. Este circuito se activa por estímulos o actividades tales como la alimentación, el sexo y la estimulación social. Cuando se libera dopamina en el NAc, las células de este centro límbico responden generando una sensación de placer y satisfacción. La función natural de esta respuesta es mantener al individuo enfocado en aquellas actividades que promueven las metas básicas de la supervivencia y la reproducción.

Las drogas de abuso mediante diferentes mecanismos usurpan este circuito y comparten con los reforzadores naturales la capacidad de activar la neurotransmisión dopaminérgica (Koob y Le Moal, 1997; Koob y Nestler, 1997), pero a diferencia de estos, lo hacen de una manera más intensa y persistente y sin estar asociado a resultados conductuales productivos.

Existe evidencia considerable que muestra una desregulación del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico tras la administración repetida de diferentes drogas de abuso. A pesar de sus diferencias moleculares y estructurales, drogas tales como alcohol, nicotina, opiáceos, cannabinoides y psicoestimulantes producen un aumento en los niveles extracelulares de dopamina en el NAc (Di Chiara y col., 1993a), lo cual ha sido asociado con su efecto reforzante.

Por otra parte, se ha demostrado que el incremento de la transmisión dopaminérgica a nivel de la vía mesocorticolímbica no sólo es un mecanismo crítico para los efectos reforzantes de las drogas de abuso sino que también media la activación motora inducida por los psicoestimulantes (Kalivas y Duffy, 1990a). Es así que el incremento extracelular de dopamina en el NAc estaría asociado a dos importantes efectos farmacológicos de los psicoestimulantes: el efecto estimulante motor y el efecto reforzante, los cuales son considerados elementos críticos para el abuso potencial de esta droga.

Conjuntamente con el sistema dopaminérgico, otro sistema neuroquímico, el sistema opioide endógeno (SOE), ocupa una posición central dentro del circuito de la motivación y desempeña con el sistema dopaminérgico, un importante papel en los cambios adaptativos producidos por los psicoestimulantes y otras drogas de abuso (LeMerrer y col., 2009; Trigo y col., 2009).

EL SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO (SOE)

El SOE es un sistema neurobiológico compuesto por receptores (receptores opioides) y sustancias transmisoras (péptidos opioides endógenos), los cuales están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico. Su amplia distribución se encuentra relacionada con las múltiples funciones fisiológicas que media, tales como la regulación de los circuitos neuronales de la nocicepción, de la motivación y del aprendizaje y la memoria (Bodnar y col., 2008). Este sistema también regula otras funciones fisiológicas tales como la respuesta a estrés, la función respiratoria y gastrointestinal, así como también la función endócrina e inmune.

Receptores opioides

Las similitudes estructurales entre todas las sustancias de acción opiácea y el descubrimiento de los agonistas, antagonistas y agonistas mixtos (Tabla 1), generaron el concepto de los receptores de opiáceos. Se distinguen los receptores de tipo μ , los cuales tras su activación producen analgesia, hipotermia y miosis, entre otros efectos. El de tipo κ , que induce depresión de los reflejos flexores y sedación, entre otros y de tipo σ que induce taquicardia, delirio, y aumento de la frecuencia respiratoria tras su activación. Más tarde, se identificó un cuarto tipo de receptor opioide llamado δ (Lord y col., 1977). La investigación adicional reveló que el receptor de tipo σ no es opioide en la naturaleza, ya que no guarda similitudes estructurales con el resto de los receptores, dejando tres familias principales de receptores opioides: la familia μ -, δ - y κ -opioide. Estos son receptores de siete dominios transmembrana pertenecientes a la familia de receptores acoplados a la proteína G. La unión de un agonista opioide a su receptor inicia la activación de la proteína G, que resulta en la disociación de la subunidad $G_{\alpha i}$ del dímero inhibidor $G\beta\gamma$ (Law y col., 2000). Las subunidades $G_{\alpha i}$ y $G\beta\gamma$ disociadas median el accionar de un conjunto de efectores que

incluye: la inhibición de la actividad de la AC, la inhibición de la apertura de canales de Ca^{++} tipo N y L, la apertura de canales de K^{+} rectificadores, la activación de proteínas-quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la proteína fosfatidilinositol 3-quinasa (Pi3K) y la PLC, tal como se observa ilustrado en la Figura 5.

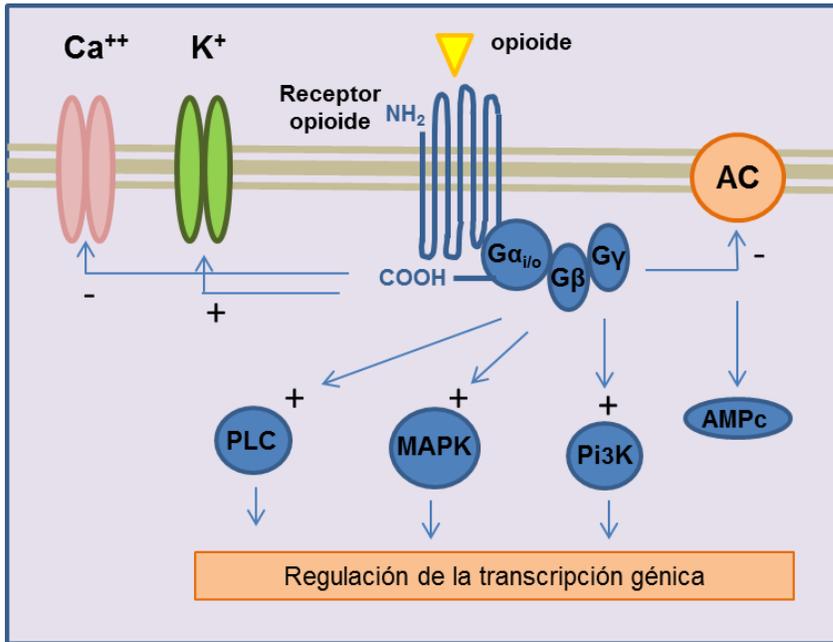


Figura 5. Receptor opioide y sus efectores intracelulares. MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno. PLC: Fosfolipasa C. Pi3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa. AC: Adenilato ciclasa.

Estos efectores controlan importantes vías intracelulares de transducción de señales que regulan las respuestas celulares y la expresión génica. Los efectos en la membrana celular tras la activación de los receptores opioides, reducen tanto la excitabilidad neuronal (ya que al incrementarse la conductancia de K^{+} se hiperpolariza la membrana) como la liberación del neurotransmisor (debido a la inhibición de la entrada de Ca^{++}). El efecto es, por consiguiente, una inhibición celular. No obstante, su activación puede aumentar la actividad de determinadas vías neuronales, por la supresión de la descarga de interneuronas inhibitorias.

Los receptores opioides se distribuyen ampliamente dentro del sistema nervioso central (SNC) (Mansour y col., 1995a). Pueden estar ubicados a nivel pre o post-sináptico, en aferentes glutamatergicos, GABAérgicos, dopaminérgicos o colinérgicos. Su localización a nivel pre-sináptico está asociada con la inhibición de la liberación del

neurotransmisor principal de la célula. A nivel post-sináptico pueden co-localizar con receptores que responden a neurotransmisores excitatorios sugiriendo su participación en mecanismos comunes de transducción de señales. Por ejemplo, se ha reportado que los receptores μ -opioides pueden aumentar las respuestas post-sinápticas tras la estimulación del receptor glutamatérgico N-metil D-aspartato (NMDA) (Martin y col., 1997). Así, la respuesta global tras la activación de un receptor opioide, dependerá no solo de la concentración y duración de la actividad del agonista sobre el mismo, sino también de su localización celular dentro de un determinado circuito neuronal.

	μ	δ	κ
Péptidos opioides endógenos			
β -endorfinas	+++	+++	+
Enkefalinas	++	+++	
Dinorfinas	+	+	+++
Fármacos opiáceos			
Agonistas puros			
Morfina, codeína	+++	+	+
Metadona	+++		
Fentanilo	+++		
Sufentanilo	+++	+	+
Agonistas - Antagonistas parciales/mixtos			
Nabulfina	---		++
Nalorfina	---		+
Buprenorfina	P		--
Butorfanol	P		+++
Pentazocina	P		++
Antagonistas			
Naloxone	---	-	--
Naltrexone	---	-	---
Drogas experimentales			
DAMGO	+++		
DPDPE		++	
U50448			+++
CTOP	---		

Tabla 1. Selectividad y afinidad de los distintos fármacos opiáceos y péptidos opioides endógenos por los diferentes receptores. Los símbolos + representan actividad agonista, los símbolos - denotan actividad antagonista, **P** indica actividad agonista parcial. El número de símbolos + o - es un indicador de la selectividad y potencia de cada droga sobre el receptor.

Péptidos opioides endógenos.

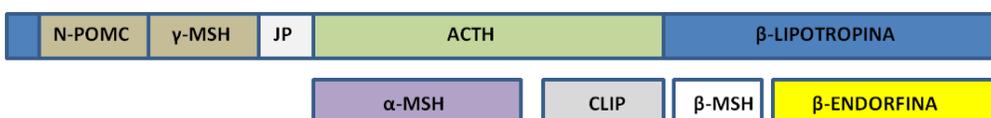
La búsqueda de sitios de unión a opiáceos, alentó la investigación de compuestos endógenos con acción opiácea. El primer péptido opioide endógeno en ser aislado y caracterizado fue la encefalina (Hughes y col., 1975). Posteriormente se aislaron las β -endorfinas (Bradbury y col., 1976) y las dinorfinas (Goldstein y col., 1979; 1981).

Los opioides endógenos son generados por procesamiento enzimático a partir de tres moléculas precursoras: pro-opiomelanocortina (POMC), proencefalina, y prodinorfina (Nakanishi y col., 1979; Kakidani y col., 1982; Noda y col., 1982) (Figura 6). Cada uno de estos precursores tiene un patrón único de distribución anatómica en todo el SNC y en órganos periféricos. El lóbulo anterior y neurointermedio de la glándula pituitaria son los principales sitios de biosíntesis de POMC. En el cerebro, hay dos núcleos que contienen las neuronas POMC: el núcleo arcuato del hipotálamo y el núcleo del tracto solitario. Proyecciones generalizadas de estas neuronas están presentes en todo el SNC. Las neuronas que contienen proencefalina y prodinorfina se distribuyen ampliamente por todo el SNC formando circuitos encefalinérgicos y dinorfinérgicos locales y neuronas de proyección.

Pre-proencefalina



Pre-proopiomelanocortina



Pre-prodinorfina



Figura 6. Características estructurales de pro-neuropéptidos opioides. Dentro de la estructura de las proteínas precursoras, los neurotransmisores peptídicos activos están flanqueados por residuos básicos que representan sitios de procesamiento proteolítico para generar neuropéptidos activos. Las proteínas precursoras se muestran para pre-proencefalina, pre-prodinorfina y pre-proopiomelanocortina.

La β -endorfina y las encefalinas, mostraron inducir acciones similares a la morfina en una serie de procedimientos de ensayo in vivo e in vitro. La administración repetida de β -endorfina produce tolerancia a su acción analgésica (Van Ree y col., 1976). Por otra parte,

β -endorfinas y las encefalinas fueron auto-administradas por animales de laboratorio, lo que indica las propiedades reforzantes y el potencial adictivo de estas sustancias (Belluzzi y Stein, 1977; Goeders y col., 1984). Por lo tanto, los opioides endógenos pueden compartir todas sus acciones opioides típicas con la morfina, tanto después de su administración aguda o crónica.

Los péptidos opioides endógenos exhiben diferente afinidad para los distintos receptores opioides (Tabla 1): β -endorfina se une con alta afinidad a los receptores μ -opioides, y con menor afinidad a los receptores δ y κ -opioides. Las encefalinas tienen alta afinidad por los receptores δ -opioides, pero también poseen buena afinidad por los receptores μ -opioides. Las dinorfinas se unen con gran afinidad a los receptores κ -opioides, aunque también demostraron buena afinidad por los receptores δ - y μ -opioides. (Mansour y col., 1995b)

Proencefalina y péptidos derivados: sistema encefalinérgico.

La proencefalina se ha conservado sustancialmente desde el *Xenopus* hasta el ser humano. Dicha proteína, es la molécula precursora de los pentapéptidos metionina-encefalina (met-encefalina), un pentapéptido formado por Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, la leucina-encefalina (leu-encefalina), formada por la misma secuencia de aminoácidos, pero con leucina en lugar de metionina y varias formas extendidas de estos dos pentapéptidos (ej.: met-encefalina-Arg-Phe y met-encefalina-Arg-Gly-Leu).

Síntesis, almacenamiento y liberación.

El gen que codifica para la proencefalina está compuesto por tres o cuatro exones equivalentes, ya sea en ratones o humanos, respectivamente. En todos los casos, al transcribirse el gen se genera un ARNm transcripto primario que, al comenzar su traducción, da lugar a una proteína mayor llamada pre-proencefalina (Figura 7A). Los primeros 24 aminoácidos de la misma corresponden a una secuencia o péptido señal que le permite entrar a la vía secretoria y que luego será eliminada co-transduccionalmente al ingresar al retículo endoplásmico (Sabol y col., 1983). La proteína resultante ingresa al aparato de Golgi y luego es almacenada en vesículas secretoras, denominadas vesículas de centro denso (DCV) (Cheng y col., 1995) o gránulos secretorios inmaduros para luego

transformarse en gránulos maduros conteniendo los neuropéptidos activos y listos para ser liberados (Figura 7B).

Para generar péptidos biológicamente activos, la proencefalina debe sufrir un procesamiento enzimático post-traducciona que puede incluir fosforilación, glicosilación, sulfatación, metilación, acetilación y un proceso proteolítico (Lindberg y col., 1991). Las enzimas encargadas del procesamiento proteolítico de proencefalina son las convertasas de pro-hormonas (PC1/3 y PC2), Catepsina L y Arg/Lys aminopeptidasas localizadas en las vesículas secretorias (Seidah y Prat, 2002; Hook y col., 2008; Yasothornsrikul y col., 1998; 2003). Los péptidos derivados del procesamiento de proencefalina almacenados en las DCV son liberados por exocitosis en respuesta a una depolarización neuronal prolongada. Finalmente, peptidasas específicas (encefalinasas) son las encargadas de degradar la encefalina en el espacio extracelular luego de ser liberada. También se ha descrito un posible mecanismo de recaptación de encefalina a nivel de la terminal nerviosa (Roy y col., 1982).

A nivel del cuerpo estriado (dorsal y ventral) la síntesis de encefalina se encuentra regulada por los neurotransmisores dopamina, acetilcolina y glutamato (Liste y col., 1999; Lucas y Harlan, 1995). Se ha observado que drogas psicoestimulantes (cocaína y anfetamina) las cuales inducen un incremento en los niveles de dopamina en el NAc, aumentan la expresión del ARNm de proencefalina en dicha área cerebral (Hurd y col., 1992; Wang y McGinty, 1995), a través de un mecanismo mediado por receptores dopaminérgicos D1/D2 (Wang y McGinty, 1996). Se ha demostrado que agonistas muscarínicos estimulan, mientras antagonistas muscarínicos inhiben el aumento inducido por psicoestimulantes en la expresión del ARNm para proencefalina (Lucas y Harlan, 1995), sugiriendo que los aumentos en la liberación de Ach inducida por psicoestimulantes modulan la expresión de proencefalina en el cuerpo estriado, a través de un mecanismo mediado por los receptores muscarínicos localizado en las neuronas encefalinérgicas estriatales (Wang y McGinty, 1997). Además de dopamina y acetilcolina, glutamato también controla la expresión de proencefalina en el cuerpo estriado: el bloqueo de receptores glutamatérgicos de tipo α -amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxiazolpropiónico (AMPA) y NMDA inhibe el aumento inducido por anfetamina en los niveles del ARNm para proencefalina (Liste et al, 1999; Mao y Wang, 2003). La síntesis de proencefalina

también puede encontrarse alterada por la acción de los péptidos opioides que poseen actividad agonística sobre receptores μ y δ , sugiriendo un mecanismo de autoregulación que controla la expresión de este neuropéptido a nivel del cuerpo estriado (González-Nicolini y col., 2003; Chen y col., 2004).

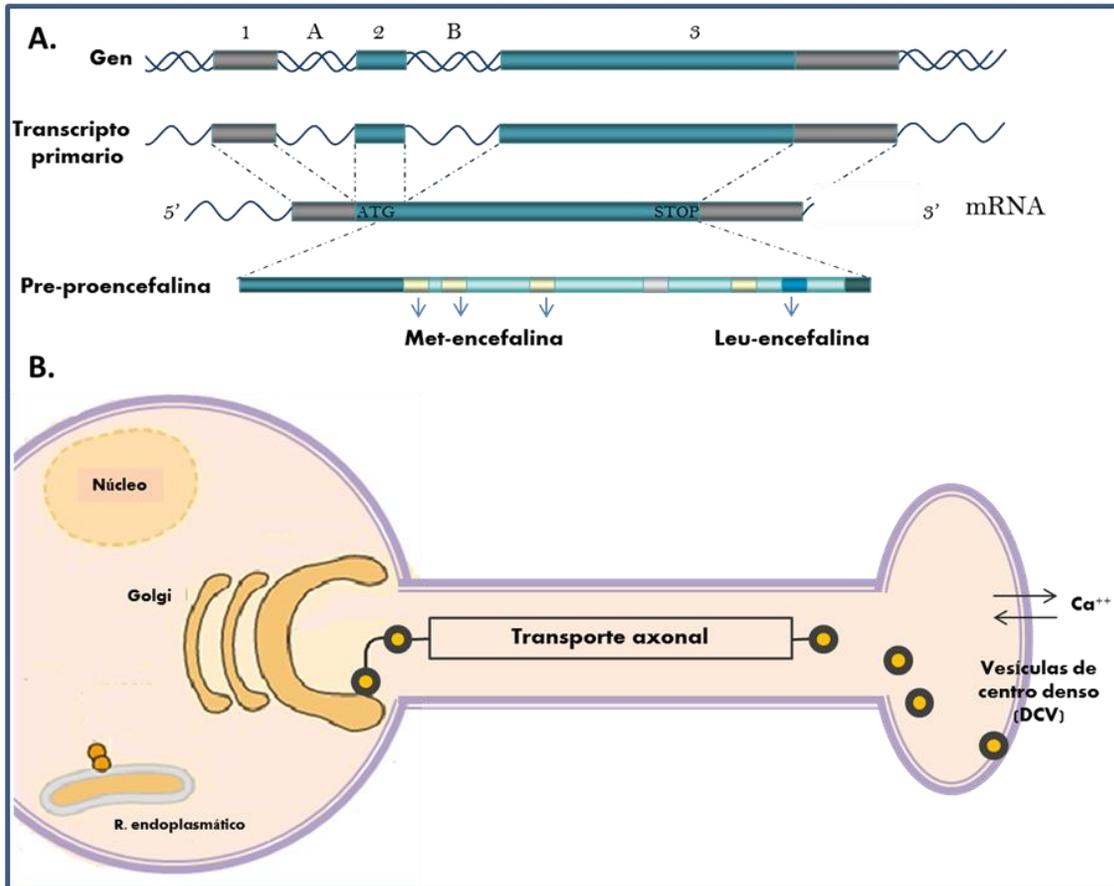


Figura 7. Síntesis de péptidos derivados del gen de proencefalina. A) Gen codificante para proencefalina, transcrito primario y proteína precursora de los péptidos met y leu-enkefalina. B) Síntesis neuronal de péptidos opioides.

Localización

Proencefalina es el precursor de péptidos opioides más abundante y ampliamente distribuido en el cerebro. Se detecta ARNm para dicha proteína en toda la corteza, el tálamo, el sistema límbico y la región mesencefálica.

En el cuerpo estriado (dorsal y ventral) las neuronas conteniendo enkefalina corresponden a MSN GABAérgicas que expresan el receptor dopaminérgico D2, las cuales proyectan Al núcleo ventral pálido, pero también puede encontrarse en interneuronas

aespinosas intrínsecas de dicha área cerebral. A este nivel, los colaterales de las MSN forman una red local densa formando sinapsis funcionales con otras MSN. Estudios ultraestructurales han demostrado que las terminales axonales que contienen encefalina hacen sinapsis de tipo simétricas, y también asimétricas, con células nerviosas del cuerpo estriado, sugiriendo que encefalina liberada desde los colaterales de las MSN, también puede influenciar o modular la actividad intrínseca del circuito local que conforma (McCollum y col., 2012).

Se ha demostrado que en el ATV encefalina principalmente co-localiza con GABA, tanto en terminales axonales que proyectan desde el núcleo ventral pálido, así como también en neuronas GABAérgicas intrínsecas de dicha área cerebral (Sesack y Pickel, 1992; 1995). Estudios ultraestructurales han demostrado que las terminales axonales conteniendo encefalina en ATV pueden originarse a partir de otras fuentes, principalmente la CPf, el hipotálamo, amígdala o de los núcleos del rafe (Fallon y Leslie, 1986; Harlan y col., 1987). Las neuronas conteniendo encefalina en ATV forman sinapsis simétricas con dendritas de células nerviosas las cuales expresan receptores μ -opioides extrasinápticos y también con terminales axonales que contienen dicho receptor (Garzón y Pickel, 2002), los cuales se encuentran localizados preferentemente en células no dopaminérgicas, presumiblemente interneuronas GABAérgicas (Garzón y Pickel, 2001). Así, la localización ultraestructural de encefalina en ATV guarda correlación con la modulación que ejerce sobre la neurotransmisión mesolímbica.

Influencia de encefalina sobre la neurotransmisión mesocorticolímbica.

Hay un gran cuerpo de evidencias que demuestran que el SOE juega un papel clave en la regulación el estado de ánimo, los procesos de recompensa del cerebro y la modulación de los efectos conductuales y neuroquímicos de múltiples drogas de abuso. En consecuencia, los diferentes componentes del SOE se expresan ampliamente en los circuitos cerebrales de la recompensa. Particularmente, se sabe que encefalina puede influenciar robustamente la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica dentro del circuito de la motivación, participando conjuntamente con otros componentes del SOE en el balance de la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria dentro de dicho circuito.

Así, encefalina liberada en ATV actúa sobre receptores μ -opioides localizados en interneuronas GABAérgicas las cuales están encargadas de regular la actividad de las células dopaminérgicas en esta área cerebral (Garzón y Pickel, 2002). La activación de los receptores μ -opioides hiperpolariza dichas interneuronas y consecuentemente da lugar a un incremento en la excitabilidad de las células dopaminérgicas por desinhibición (Spanagel y col., 1990; 1992; Johnson y North 1992) (Figura 8).

Encefalina también posee un rol permisivo sobre la liberación de dopamina a nivel del NAc (Dourmap y col., 1990). En esta área cerebral, los receptores μ -opioides están localizados preferentemente en la membrana extra-sináptica del soma y dendritas de las MSN que contienen receptores dopaminérgicos D1, y neuronas GABAérgicas espinosas, correspondientes a interneuronas intrínsecas del NAc (Svingos y col., 1997; 1996), así como también en las terminales axonales de dichas células. Esta localización se corresponde principalmente con acciones inhibitorias post-sinápticas tras la activación del receptor μ -opioides en las neuronas locales y de proyección de esta área cerebral. En el NAc los receptores δ -opioides tienen una localización preferentemente pre-sináptica en aferentes glutamatérgicos y en interneuronas colinérgicas accumbales (Svingos y col 1998). Se ha reportado que análogos sintéticos de encefalina con alta afinidad por los receptores μ -opioides [D-Ala2, N-Me-Phe4,Gly5-ol]-encefalina y δ -opioides [D-Pen2,5]-encefalina y [D-Ser2]Leu-encefalina-Thr6 administrados intra-NAc producen un incremento en los niveles extracelulares de dopamina en dicha área cerebral de una manera dependiente de la dosis administrada (Hiroshi y col., 2005; Hipólito y col., 2008; Yoshida y col., 1999). Los mecanismos propuestos para explicar este efecto, se basan en la acción de encefalina sobre receptores μ - y δ -opioides localizados en interneuronas GABAérgicas inhibitorias locales lo que provoca una hiperpolarización de las mismas y, consecuentemente, una reducción en la liberación de GABA (Jian y North 1992). Otro mecanismo involucra la activación de receptores μ - y δ -opioides localizados en interneuronas colinérgicas del NAc reduciendo la liberación de Ach (Mulder y col., 1984, Heijna y col., 1990), y facilitando la liberación de dopamina en dicha área cerebral a través un mecanismo indirecto (Britt y McGehee, 2008) (Figura 8).

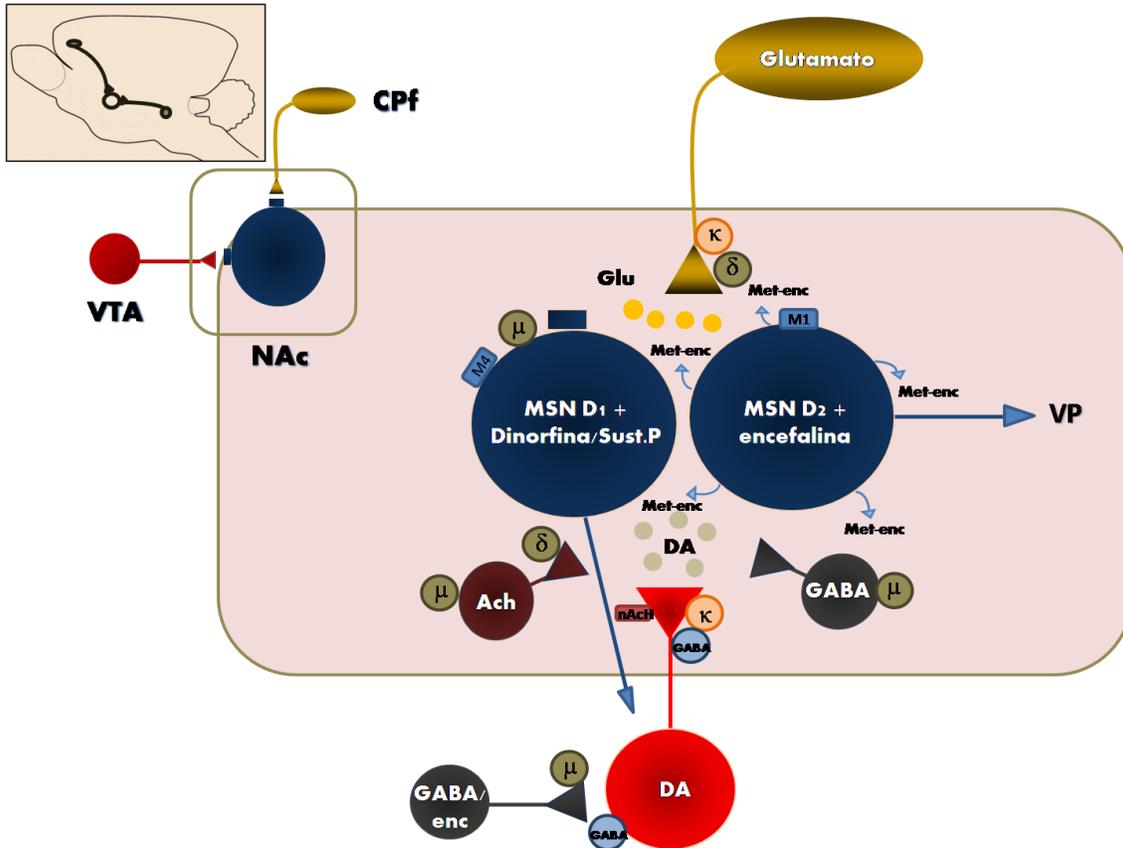


Figura 8. Modulación ejercida por encefalina sobre el circuito mesocorticolímbico. VP: núcleo ventral pálido, DA: dopamina, Ach: acetilcolina, Glu: glutamato, met-enc: metionina-encefalina, GABA: γ -aminobutírico. M1 y M4: receptores muscarínico de acetilcolina tipo 1 y 4, respectivamente, nACh: receptor nicotínico de acetilcolina.

Por otra parte, se ha reportado que análogos sintéticos de encefalina (D-Pen2, D-Pen5-encefalina) al actuar sobre receptores δ -opioides pre-sinápticos, tendrían un rol permisivo en la liberación de glutamato en el cuerpo estriado. La activación de los receptores δ -opioides pre-sinápticos favorecería la liberación del neurotransmisor mediante un mecanismo directo, que involucra la formación de inositol 3 fosfato (IP_3) y la movilización de Ca^{++} intracelular (Smart y Lambert, 1996), y por un mecanismo indirecto donde participan interneuronas colinérgicas estriatales. A su vez, el aumento en la liberación de dopamina inducida por encefalina, también dependería de la liberación de glutamato desde los aferentes corticales en respuesta a la estimulación de los receptores δ -opioides pre-sinápticos (Billet y col., 2004).

De lo expuesto previamente, se puede catalogar al sistema encefalinérgico como un sistema neurobiológico complejo. Se expresa ampliamente en el SNC, estando presente en circuitos locales y en neuronas de proyección. Involucra numerosas moléculas incluyendo la proteína precursora y los péptidos derivados de su procesamiento, los cuales tienen actividad tanto sobre receptores δ -opioides como μ -opioides. Posee importantes funciones fisiológicas, entre las cuales la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica dentro del circuito de la motivación sugiere un papel consecuente del sistema encefalinérgico en el desarrollo de conductas asociadas a la adicción a psicoestimulantes.

SENSIBILIZACIÓN CONDUCTUAL A PSICOESTIMULANTES

Muchas de las teorías propuestas para explicar el proceso de adicción postulan que los adictos consumen drogas por dos razones: para experimentar los efectos hedónicos positivos de la misma o para evitar los efectos aversivos de los síntomas de abstinencia (Markou y col., 1993). En otras palabras, la motivación de los adictos para consumir droga radica en el placer que les genera consumir la sustancia o aliviar los efectos no placenteros de la abstinencia. Sin embargo, los patrones compulsivos de búsqueda y administración de las drogas que caracterizan al proceso adictivo muchas veces no son motivados por el placer de consumir la droga o aminorar los síntomas de abstinencia. En este sentido, el concepto de sensibilización motivacional (*'incentive sensitization'* Robinson and Berridge, 2001), postula que la sensibilización producida por las drogas genera una atribución excesiva de la saliencia motivacional (*incentive-saliency*) responsable de los patrones compulsivos de búsqueda y administración de la droga. Esta teoría plantea que las drogas de abuso provocan cambios a largo plazo en los circuitos cerebrales normalmente involucrados en la motivación y la recompensa y estas neuroadaptaciones sensibilizan dichos circuitos cerebrales frente a la droga o estímulos asociados a ésta. Una de las evidencias de la sensibilización motivacional es la sensibilización conductual.

Tanto en los humanos, como en animales de experimentación, la administración repetida e intermitente de drogas psicoestimulantes, como anfetamina y cocaína, produce respuestas conductuales progresivamente mayores a las observadas inicialmente, aún

después de semanas o meses luego de la última administración. Este incremento en los efectos conductuales de los psicoestimulantes se conoce como sensibilización conductual.

El fenómeno de sensibilización conductual facilita la adquisición de la conducta de auto-administración de drogas (Piazza y col., 1989; Horger y col., 1990), constituyendo un factor relevante en los primeros encuentros con las mismas. También facilitaría la recaída ya que el fenómeno de sensibilización asociado al comportamiento de búsqueda compulsiva de la droga se ha planteado como uno de los mecanismos que ayuda a comprender la etapa de recaída. Así, la importancia de la comprensión de los mecanismos que subyacen a este fenómeno radica en el rol potencial que la sensibilización tiene sobre el desarrollo de la adicción, así como sobre la reincidencia al consumo después de largos períodos de abstinencia (Robinson y Berridge, 1993).

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

Iniciación de la sensibilización conductual a cocaína: eventos moleculares y neuroquímicos en ATV.

La iniciación de la sensibilización inducida por los psicoestimulantes se define como una secuencia de eventos celulares de duración limitada que son precipitados por la administración aguda de la droga y que conducen a cambios duraderos en la función neuronal responsables de la sensibilización.

Se ha postulado que la iniciación de la sensibilización conductual es el resultado de una cascada de eventos neuronales iniciados por el incremento transitorio en los niveles extracelulares de dopamina inducidos por cocaína en el ATV. Estos cambios en la capacidad de la cocaína para aumentar los niveles extracelulares de dopamina son transitorios, se observan un día después del cese de las inyecciones repetidas de cocaína, pero no 14 o 21 días después de la interrupción de la droga (Kalivas y Duffy 1993). Se ha demostrado que estos cambios transitorios en la transmisión dopaminérgica en el ATV se producen por una desensibilización de autoreceptores dopaminérgicos D2 (Gao y col., 1998), y una consecuente salida de K^+ , que depolariza la célula dopaminérgica y promueve la liberación de dopamina somatodendrítica (Figura 9). Los receptores dopaminérgicos D1 a nivel del ATV también están involucrados en la iniciación de la sensibilización

conductual. El aumento en los niveles de dopamina en el ATV durante el desarrollo de la sensibilización modula la liberación de glutamato en este núcleo mediante la estimulación de receptores dopaminérgicos D1 (Kalivas y col., 1995). Antagonistas de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA bloquean la iniciación de la sensibilización a cocaína (Stewart y Druhan 1993; Wolf y Jeziorski 1993; Li y col., 1997). El glutamato liberado tras la estimulación de receptores D1 pre-sinápticos estimula a receptores AMPA y NMDA localizados en las células dopaminérgicas, lo que resulta en una entrada de Na^+ y Ca^{++} y una consecuente depolarización neuronal. La entrada de Ca^{++} a través de los receptores AMPA, NMDA y canales de Ca^{++} activados por voltaje, activan diferentes segundos mensajeros intracelulares, incluidos calmodulin-quinasa II (CaMKII) y MAPK, y finalmente afectan la expresión génica tras la activación de factores de transcripción.

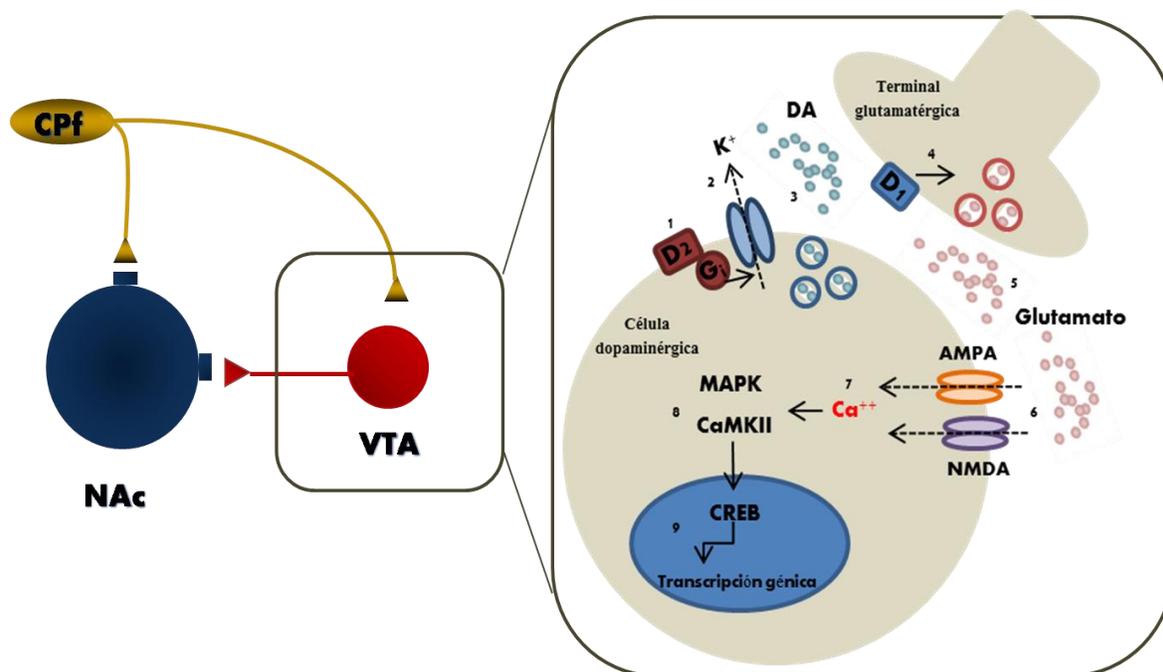


Figura 9. Eventos neuroquímicos y moleculares asociados a la iniciación de la sensibilización conductual inducida por cocaína en ATV. La liberación de dopamina somatodendrítica tras la desensibilización de autorreceptores D2 (1, 2 y 3) estimula los receptores D1 en las terminales glutamatérgicas (4), incrementando la liberación de glutamato (5). El glutamato liberado activa a receptores AMPA y NMDA (6) situados en el soma y dendritas de las células dopaminérgicas, incrementando la entrada de Ca^{++} (7). La entrada de calcio a través de los receptores AMPA y NMDA activa segundos mensajeros tales como la CaMKII y la vía de señalización de las MAPK (8), alterando finalmente la expresión génica a través de factores de transcripción tales como CREB (9) (Modificado de Licata y Pierce, 2003).

Expresión de la sensibilización conductual a cocaína.

Las alteraciones neuroquímicas y moleculares transitorias que ocurren en el ATV y subyacen la iniciación de la sensibilización conductual, son transferidas al NAc donde ocurren los principales cambios neuroadaptativos que conllevan a la expresión de la sensibilización conductual ante una nueva exposición a la droga (Kalivas y Stewart, 1991; Pierce y Kalivas, 1997a). Así, esta nueva exposición es necesaria para poner de manifiesto el fenómeno de sensibilización que se inició con los primeros contactos con la droga. Los eventos neuronales de la expresión se asientan en diversos núcleos que conforman el circuito de la motivación, siendo el NAc, y también la CPf y el estriado dorsal las áreas más estudiadas dentro de las terminales dopaminérgicas de esta vía (Pierce y Kalivas, 1997a).

Eventos neuroquímicos asociados a la sensibilización conductual inducida por cocaína.

La expresión de la sensibilización conductual, observada a largo término, está asociada a un incremento en los niveles extracelulares de dopamina en el NAc: la re-administración de cocaína en animales abstinentes a la droga, resulta en una respuesta sensibilizada de la actividad locomotora acompañada, generalmente, por un aumento en los niveles de dopamina en el NAc, en comparación al observado en animales tratados con vehículo (Figura 10B).

Se han reportado alteraciones moleculares en el NAc que incrementarían la liberación de dopamina en dicha área cerebral, una de ellas es el aumento en la actividad de la CaMKII. Así, el incremento en la liberación de dopamina inducido por cocaína en animales sensibilizados podría deberse a un aumento en la acción de CaMKII sobre la disponibilidad para la exocitosis de vesículas de dopamina (Vanderschuren y Kalivas, 2000). Estudios de microdiálisis *in vivo*, demuestran un incremento en la liberación de glutamato en animales sensibilizados (Kalivas y Duffy, 1998; Wolf y Xue, 1998) y una transmisión GABAérgica reducida en el ATV, lo que llevaría a un incremento en la liberación de dopamina observada en el NAc.

El fenómeno de sensibilización inducido por cocaína está asociado con aumentos en los niveles extracelulares de glutamato (Williams y Steketee, 2004) y con alteraciones en la transmisión dopaminérgica en la CPf. Una abstinencia prolongada a cocaína está asociada a

un aumento en la transmisión dopaminérgica en la CPf (Sorg y col., 1997; Chefer y col., 2000). Paralelamente a los cambios neuroquímicos, se observa una reducción de la funcionalidad de los receptores dopaminérgicos D2 y receptores glutamatérgicos metabotrópicos del grupo II (mGluR 2/3) (Bowers y col., 2004), reduciendo el tono inhibitorio de las neuronas de la CPf y permitiendo así una mayor excitabilidad de dichas células (Figura 10B).

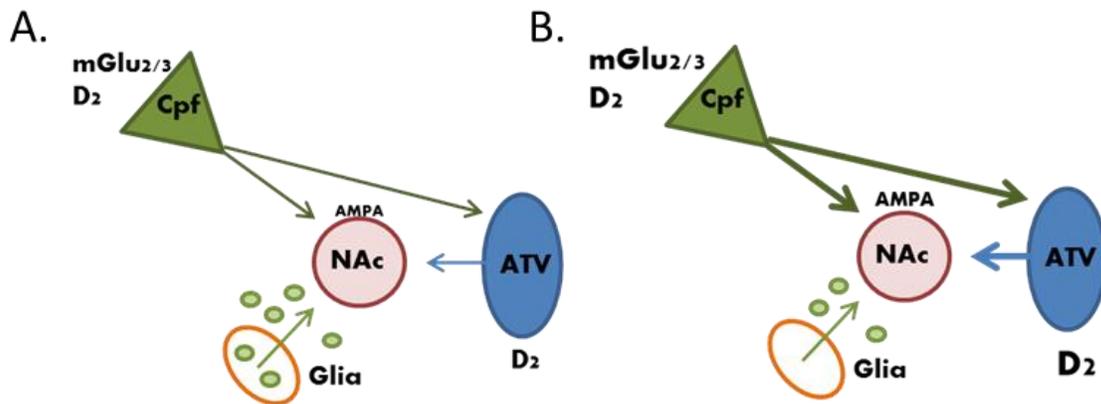


Figura 10. Principales cambios bioquímicos observados en el circuito mesocórticolímbico durante la expresión de la sensibilización (B) en comparación a la neurotransmisión normal de dicho circuito (A)

La sensibilización conductual inducida por cocaína se asocia también con una reducción de los niveles basales de glutamato en el NAc, y con un incremento en la liberación del neurotransmisor ante la re-exposición a la droga (Pierce y col., 1996; Reid y Berger, 1996; Baker y col., 2002). Esta disrupción de la homeostasis de glutamato surge de una disminución de los niveles y actividad del intercambiador de cistina-glutamato, que intercambia cistina extracelular por glutamato intracelular y es la fuente de la mayoría de glutamato extracelular en el NAc (Figura 10B). Los niveles basales reducidos de glutamato optimizan la funcionalidad e incrementan la expresión del receptor de glutamatérgico AMPA (Boudreau y Wolf, 2005; Kourrich y col., 2007) (Figura 10B). El aumento de la liberación de dicho neurotransmisor al actuar sobre estos receptores promueve la expresión de la sensibilización conductual inducida por cocaína (Pierce y col., 1996; Ghasemzadeh y col., 2003).

Eventos moleculares asociados a la sensibilización conductual inducida por cocaína.

La sensibilización conductual a cocaína está asociada a alteraciones moleculares observadas a largo término (aumento en la síntesis de determinadas proteínas y expresión de receptores), cambios epigenéticos (activación o represión transcripcional) y cambios morfológicos (en el número y forma de las espinas dendríticas) que median la naturaleza duradera del fenómeno. Estos eventos son activados por las señales dopaminérgicas y glutamatérgicas que convergen en el NAc generando alteraciones en la función neuronal responsables de los efectos a largo término inducidos por la administración repetida de cocaína (Figura 11A).

Las neuroadaptaciones inducidas por cocaína no solo están asociadas al fenómeno de sensibilización conductual, estos cambios también median conductas asociadas a la búsqueda de droga, tales como la reinstalación de la conducta de preferencia a un sitio asociado a la droga, (Van der Kooy y col., 1987; Bardo y Bevins, 2000) y la autoadministración de cocaína (Schuster y Thompson, 1969; Brady, 1991).

Entre los eventos moleculares presentes en el NAc que resultan persistentes en el tiempo y acompañan al fenómeno de sensibilización conductual se han reportado:

- un incremento en la fosforilación de la proteín-quinasa regulada por señales extracelulares (ERK)
- incrementos en la fosforilación de la proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico (CREB)
- aumentos en el factor neurotrófico derivado del cerebro(BDNF)
- inserción de subunidades GluR1 del receptor AMPA en la membrana celular

La proteín-quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y su rol en la sensibilización conductual inducida por cocaína

La cascada ERK

ERK es un miembro de la familia de las MAPK, correspondientes a proteínas quinasas que se activan por estímulos extracelulares tales como neurotransmisores y factores de crecimiento. Las dos isoformas principales de ERK son la isoforma de 44 kDa (ERK1) y 42 kDa (ERK2). ERK es el único sustrato conocido de la proteín-quinasa MEK (de MAPK/ERK kinase). Inhibidores selectivos de MEK, tales como SL327, U0126 y PD98059 previenen la fosforilación de ERK1/2. MEK es fosforilada y activada por la

proteín-quinasa Raf; Raf se activa por proteínas G pequeñas pertenecientes a la familia Ras, y su activación depende de un incremento en el influjo de Ca^{++} en la célula (Figura 11B).

Activación de ERK como componente intracelular clave en las neuroadaptaciones asociadas a la sensibilización a cocaína.

En las neuronas del cuerpo estriado, ERK2 es la enzima funcionalmente importante para los efectos inducidos por las drogas de abuso y es la isoforma que presenta una mayor activación tras la administración de psicoestimulantes (Valjent y col., 2005). La activación de ERK por psicoestimulantes puede ser bloqueada por antagonistas del receptor dopaminérgico D1. En el NAc, la activación de ERK en respuesta a cocaína se produce en las MSN que expresan dicho receptor. La activación de ERK por cocaína también involucra al receptor glutamatérgico NMDA. Es así que la interacción cooperativa entre estos dos receptores resulta en la fosforilación de ERK en esta área cerebral luego de cocaína (Gireault y col., 2008).

Los mecanismos que involucran la fosforilación de ERK1/2 en las neuronas del NAc en respuesta a cocaína incluyen la activación canales de Ca^{2+} tipo L y la vía de proteín-quinasa A (PKA) posteriormente a la estimulación de los receptores D1 por dopamina. El influjo de Ca^{2+} que resulta tras la activación de los receptores de NMDA y los canales de Ca^{2+} tipo L, se traduce en la activación de la vía Ras/Raf/MEK (Figura 11B). BDNF también puede activar a ERK a través de la vía Ras, tras la estimulación de su receptor de tipo tirosín-quinasa B (TrkB).

ERK fosforilada se detecta en dendritas y pericarion de las neuronas del NAc y rápidamente se acumula en el núcleo celular. La activación de ERK aumenta la excitabilidad de la membrana celular a través de la fosforilación de las subunidades de canales de K^+ (Kv4.2), lo que conduce a una disminución de las corrientes de K^+ hacia fuera de la célula, y en la inserción de subunidades GluR1 del receptor de AMPA en la membrana celular (Figura 11B). ERK también regula la expresión génica mediante el control directo e indirecto de la fosforilación de factores de transcripción y componentes de la cromatina. La translocación de ERK fosforilada al núcleo celular conduce a la activación de proteínas nucleares entre ellas, la proteín-quinasa activada por mitógenos y estrés (MSK1), la proteín-quinasa ribosomal S6 (RSK) y el factor de transcripción Elk-1. MSK-1

juega un papel crítico en la fosforilación del factor de transcripción CREB y la histona H3, y en la transcripción de numerosos genes, entre los cuales se encuentran los genes de expresión temprana (*c-Fos*), que se inducen de forma aguda en respuesta a la estimulación neuronal.

En base a estas evidencias moleculares, existe un amplio acuerdo sobre la participación de ERK en la sensibilización conductual inducida por psicoestimulantes (Pierce y col., 1999; Valjent y col., 2005; Ferguson y col., 2006; Kim y col., 2011). En animales tratados crónicamente con cocaína o anfetamina, una dosis desafío con la droga aumenta significativamente los niveles de fosforilación de ERK2 en el NAc y estriado dorsal en comparación a lo observado en los animales control (Shi y McGinty 2007, Mattson y col., 2005). (Valjent y col., 2006). El bloqueo de la fosforilación de ERK por la administración sistémica o intra-NAc de inhibidores selectivos de MEK (UO126 o SL327) en animales tratados crónicamente con cocaína, impide la expresión de la sensibilización conductual cuando los mismos son administrados con una dosis desafío con la droga (Valjent y col., 2006; Kim y col., 2011). Las evidencias indican que cuando se activa ERK2, resultado de la interacción entre dopamina y glutamato en las MSN del NAc, coloca a la célula en un estado de 'plasticidad permisiva', sugiriendo que la activación de ERK es un evento molecular clave involucrado en la sensibilización conductual inducida por cocaína y posee un papel consecuente en el desarrollo de otras neuroadaptaciones a largo término asociadas al fenómeno.

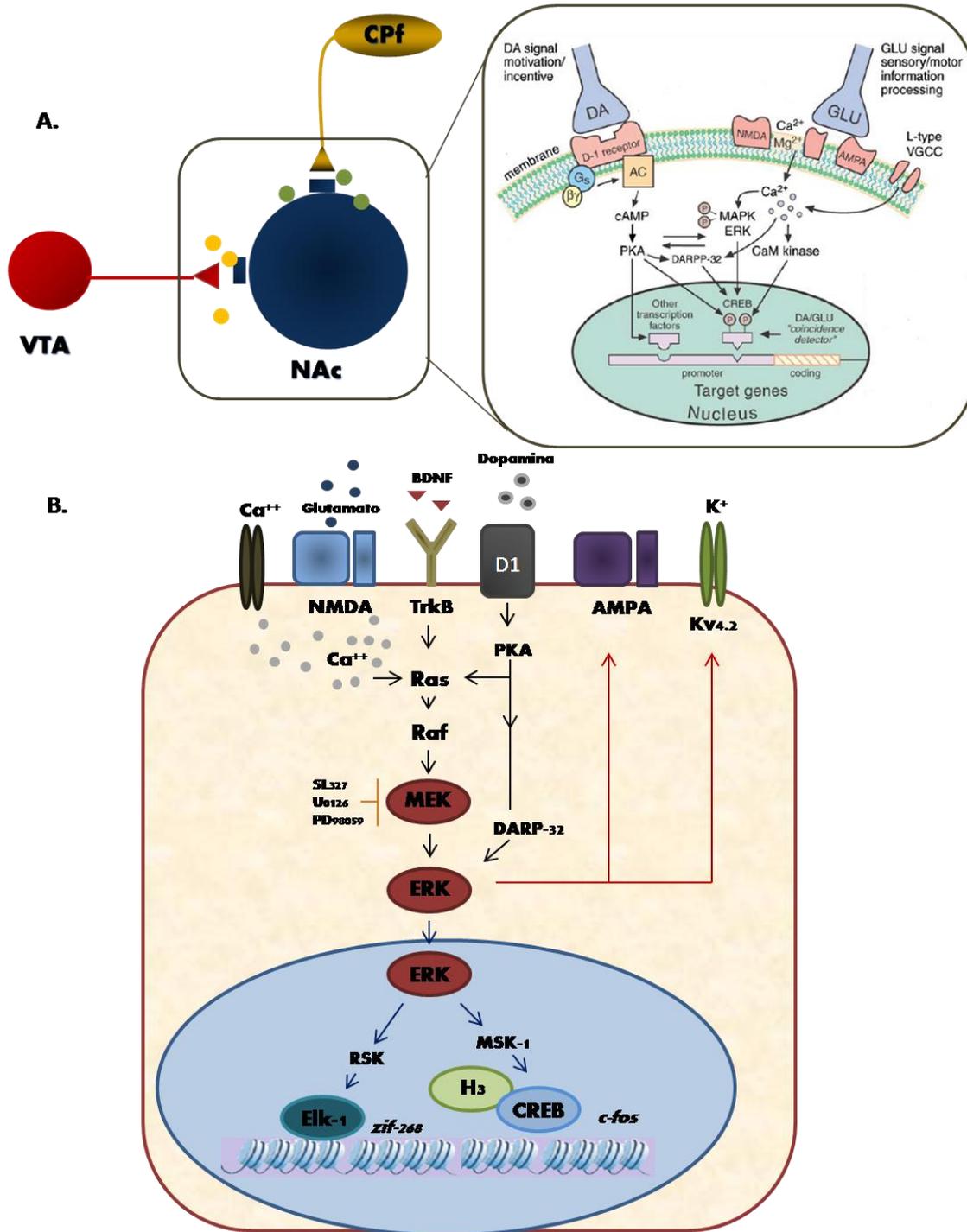


Figura 11 A y B. Eventos moleculares asociados a la sensibilización conductual inducida por cocaína. En el panel A se observa un esquema del circuito mesocorticolímbico ilustrando las señales extracelulares que convergen a nivel del NAc y activan los eventos moleculares subyacentes al fenómeno de sensibilización. El panel B muestra en detalle los mecanismos interconectados que se activan por dopamina, glutamato y BDNF luego de cocaína.

La proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico (CREB) y su rol en la sensibilización conductual inducida por cocaína.

Diversos autores han propuesto que cambios en la transcripción génica a través de acciones sobre factores de transcripción, modificaciones de la cromatina y ARN no codificante podrían explicar la durabilidad de las alteraciones conductuales que subyacen el fenómeno de sensibilización y otros aspectos asociados al proceso adictivo.

El mecanismo clásico de la regulación de la expresión génica es a través de las acciones de las drogas de abuso sobre los factores de transcripción. Aunque las neuronas contienen cientos de factores de transcripción, estudios sobre las neuroadaptaciones inducidas por cocaína se han centrado principalmente en un pequeño subgrupo de factores de transcripción, entre los cuales se encuentra el factor de transcripción CREB.

El factor de transcripción CREB

CREB es un miembro de la superfamilia de factores de transcripción Bzip. Se compone de un dominio C-terminal básico que es responsable de su unión al ADN y un dominio leucina que media su propia dimerización o con otros miembros de la familia de factores de transcripción CREB, incluyendo a CREM (de *cAMP response element modulator*) y ATF-1 (de *activator transcription factor 1*). El sitio CRE (de *consensus cAMP response element*) al cual se unen los dímeros CREB consiste en una secuencia palindrómica TGACGTCA. Muchos genes tienen sitios CRE en sus promotores, incluyendo neuropéptidos, enzimas que sintetizan neurotransmisores, receptores de neurotransmisores, proteínas de señalización y otros factores de transcripción. Para mediar la transcripción, CRE requiere la activación de CREB a través de la fosforilación en un residuo serina-133. La fosforilación y la posterior activación de CREB es un sitio de convergencia de varias cascadas de transducción de señales, incluyendo la vía de AMPc a través de PKA y la vía Ras/ERK. La proteína de unión a CREB (CBP) se une posteriormente al dímero de CREB fosforilado y sirve como un adaptador para el complejo de iniciación de la transcripción.

Los productos de los numerosos genes activados por CREB incluyen: otros factores de transcripción (por ejemplo, *c-fos*), mensajeros intracelulares, enzimas que sintetizan neurotransmisores (TH), factores tróficos (BDNF), los péptidos opioides endógenos

dinorfina y encefalina, y subunidades GluR1 del receptor glutamatérgico AMPA (Carlezon y col., 2005).

La activación de CREB y su rol en cambios a largo término asociados a la sensibilización inducida por cocaína.

Cocaína y otras drogas de abuso (por ejemplo anfetamina y opiáceos) aumentan la actividad de CREB medido por el aumento de su forma fosforilada (pCREB) en múltiples regiones del cerebro, incluyendo el NAc y el estriado dorsal (Carlezon y col., 2005; Edwards y col., 2007; Shi and McGinty, 2007; Mattson y col., 2005).

A nivel celular, se ha demostrado que la expresión del fenómeno de sensibilización inducido por cocaína se asocia a una hipersensibilidad de receptores dopaminérgicos D1. Este efecto se acompaña de una consecuente hiperactividad de la vía del AMPc, mediada por un incremento en los niveles de AC y PKA (Henry y White, 1991; Terwilliger y col., 1991). Animales tratados crónicamente con cocaína que recibieron un pre-tratamiento con 8-bromo-AMPc, un análogo de AMPc que activa a PKA a nivel del NAc, muestran una mayor actividad locomotora en comparación a los animales pre-tratados con solución salina cuando son desafiados con cocaína. Utilizando un inhibidor de PKA se observa el efecto opuesto (Miserendino y Nestler, 1995).

Se ha demostrado que la AC-1 y AC-8 son necesarias para la fosforilación de ERK y MSK-1. Después de un tratamiento con cocaína, no se observan incrementos en la señalización ERK/MSK-1 en las MSN del estriado de ratones knockout para AC-1/AC-8. Consecuentemente, los animales con esta mutación no expresan el fenómeno de la sensibilización conductual inducido por la droga (DiRocco y col., 2009). Así, tanto la activación de la vía AC/AMPc/PKA como la vía ERK/MSK-1 son necesarias para la fosforilación de CREB inducida por cocaína, y a su vez, la activación de estas vías de señalización a nivel de la NAc tienen un rol clave en la sensibilización conductual inducida por la droga.

Alteraciones en la expresión del receptor glutamatérgico AMPA y su participación en la sensibilización conductual inducida por cocaína.

Una de las principales neuroadaptaciones asociadas al fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína, involucra cambios en la transmisión glutamatérgica mediada por el receptor AMPA.

Los receptores AMPA median la mayoría de los efectos de la transmisión de tipo excitatoria del cerebro. Los cambios en la fuerza sináptica en muchas formas de plasticidad neuronal están mediadas por el tráfico de dicho receptor dentro y fuera de la sinapsis.

Los receptores de AMPA son canales iónicos activados por ligando que se expresan ubicuamente en todo el cerebro. Los múltiples subtipos de receptores AMPA, se componen de diferentes combinaciones de subunidades denominadas GluR1-4, GluR1 y GluR2. La conversión de una glutamina por una arginina hace que el receptor AMPA que contenga subunidades GluR2 sea impermeable a Ca^{++} . En el NAc, la mayoría de los receptores AMPA están conformados por asociaciones de subunidades GluR1 y GluR2 y una pequeña proporción de receptores formados por subunidades GluR1 y GluR3. La expresión de superficie de receptores AMPA en el NAc de animales sensibilizados a cocaína aumenta significativamente luego de 7, 14 o 21 días de abstinencia a la droga (Boudreau y Wolf 2005; Boudreau y col., 2007; Ferrario y col., 2010), en comparación a lo observado en animales tratados con salina. Los receptores conteniendo subunidades GluR1 son la principal población de receptores AMPA que aumenta su expresión en la superficie celular del NAc luego de cocaína. La relación AMPA/NMDA también aumenta en respuesta a cocaína en dicha área cerebral transcurridos 14 días desde la última administración de la droga (Kourrich y col., 2007). Estos resultados bioquímicos y electrofisiológicos reflejan el mismo efecto: una facilitación en la transmisión sináptica en el NAc luego de cocaína, producto de un incremento tanto en la expresión como en la funcionalidad de los receptores AMPA en las MSN de dicha área cerebral.

La estimulación de los receptores D1 aumenta rápidamente la expresión en superficie de los receptores AMPA y facilita la incorporación sináptica de estos receptores en las neuronas del NAc. Los animales sensibilizados a cocaína muestran un incremento en la fosforilación de ERK en paralelo con un aumento de la expresión en superficie de receptores AMPA en la NAc (Boudreau y col., 2007), indicando que la señalización de ERK es la responsable del aumento en la expresión de los receptores AMPA en el NAc de animales sensibilizados a cocaína. De acuerdo con los resultados bioquímicos,

microinyecciones de AMPA en el NAc producen una mayor respuesta en la actividad locomotora en los animales sensibilizados a cocaína en comparación con los controles, mientras que la inyección intra-NAc de CNQX, un antagonista del receptor AMPA, bloquea la expresión de la sensibilización conductual inducida por la droga (Pierce y col., 1996; Ghasemzadeh y col., 2003).

El incremento en la expresión de receptores AMPA en el NAc representaría una forma de plasticidad homeostática desencadenada por una hipoactividad inducida por cocaína en las regiones corticales que envían proyecciones de glutamatérgicas al NAc. Así, el aumento en la expresión de receptores AMPA que acompaña la sensibilización conductual aumenta la capacidad de respuesta de MSN a las aferencias glutamatérgicas corticales.

Alteraciones en los niveles del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y su rol en la sensibilización conductual inducida por cocaína.

El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)

Los factores neurotróficos o neurotrofinas son pequeñas moléculas sintetizadas en el sistema nervioso, conocidas por su rol en la mediación de procesos tales como el crecimiento, la supervivencia y diferenciación neuronal durante el desarrollo del organismo. BDNF es una proteína de 13 KDa sintetizada en el cerebro en forma de pro-neurotrofina (proBDNF) que posteriormente es procesada por distintas enzimas tanto dentro como fuera de las neuronas y células gliales, dando la forma madura de la neurotrofina. Dicha molécula ejerce su efecto biológico a través de la unión y consecuente activación de su receptor, TrkB. Este evento es seguido de la activación de cascadas de señalización intracelular que, en el caso de los receptores Trks, pueden ocurrir por tres vías: PLC, MAPK, PI3K. Sin embargo, existen numerosas evidencias que demuestran la selectiva señalización de TrkB a través de MAPK en animales expuestos a cocaína.

La expresión de BDNF varía a lo largo del sistema mesocórticolímbico. En el NAc, la expresión basal de esta neurotrofina es muy baja (Graham y col., 2007) estableciéndose a la CPf como la fuente principal de BDNF hacia dicho núcleo. También es sabido que los aferentes dopaminérgicos que proyectan desde ATV hacia el NAc producen y liberan BDNF, aunque en menor cantidad (Altar y col., 1997). A su vez, existen evidencias que

demuestran un transporte retrógrado de esta neurotrofina desde el NAc hacia el ATV (Conner y col., 1997). En cuanto al receptor de BDNF, existen evidencias demostrando una alta expresión de mRNA para TrkB tanto en el cuerpo estriado como en CPf y una menor expresión de dicho mRNA en la región mesencefálica (Altar y col., 1994).

Participación del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en la sensibilización conductual inducida por cocaína.

La exposición crónica a cocaína produce importantes modificaciones en la vía de señalización de BDNF/TrkB. La administración repetida de cocaína produce en un incremento en el mRNA que codifica para BDNF en la CPf el cual se prolonga hasta 3 días posteriores a la última inyección de la droga. Si bien la producción basal de BDNF en el NAc es baja, la administración crónica de cocaína incrementa significativamente los niveles de esta neurotrofina en dicha área cerebral, debido tanto a síntesis local (evidenciada por un aumento de su mRNA) como a la liberación desde los aferentes glutamérgicos corticales o dopaminérgicos que proyectan del ATV (Graham y col., 2007; McGinty y col., 2011; Grimm y col., 2003; Filip y col., 2006).

La infusión intra-NAc o intra-ATV de BDNF produce una respuesta incrementada de los animales al efecto estimulante motores inducidos por cocaína, consecuentemente los mismos desarrollan sensibilización conductual a la droga en menor tiempo y con dosis bajas (umbrales) de la droga, en comparación a lo observado en los animales infundidos con vehículo (Horger y col., 1999). Resultados similares fueron obtenidos sobre-expresando los niveles de BDNF por medio de infecciones virales con plásmidos (Bahi y col., 2008) o utilizando herramientas de optogenéticas (Lobo y col., 2011). En contraste con estas observaciones, los animales heterocigotos para BDNF (+/-) muestran un retraso en el desarrollo de sensibilización conductual inducido por cocaína en comparación a lo observado en los ratones *wild type* (Horger y col., 1999, Hall y col., 2003). La administración crónica de cocaína, la cual incrementa los niveles de BDNF en el NAc, aumenta paralelamente la ramificación de las dendritas y el número de espinas dendríticas dentro de esta área cerebral (Russo y col., 2009), estableciéndose una relación causal entre el aumento de los niveles de dicha neurotrofina y los cambios morfológicos de las células nerviosas en el NAc.

En consistencia con los incrementos en BDNF, la administración de cocaína también modifica los niveles de fosforilación de TrkB (un marcador de la activación del receptor TrkB) en el NAc. La inhibición de la activación de TrkB utilizando ratones transgénicos que expresan una forma dominante negativa del receptor (dnTrkB), se traduce en una falla de la expresión de la sensibilización conductual inducida por cocaína (Crooks y col., 2010). Además, se ha postulado que un aumento de la activación de TrkB sobre las terminales dopaminérgicas que proyectan desde ATV hacia el NAc promueven un aumento de la liberación de dopamina (Seroogy y col., 1994.) contribuyendo a la los efectos conductuales inducidos por cocaína.

Estas evidencias indican que la activación de la señalización BDNF/TrkB por cocaína, es una de las neuroadaptaciones fundamentales inducida por la droga necesarias para el desarrollo del fenómeno de sensibilización. A su vez, la activación de esta vía luego de la exposición crónica a cocaína resulta necesaria para el establecimiento de alteraciones morfológicas y moleculares que sustentan la durabilidad del fenómeno.

Participación del SOE en la sensibilización a conductual a cocaína: rol de encefalina y sus receptores.

Numerosas evidencias enfatizan la relevancia del SOE, el cual converge con el sistema dopaminérgico en el circuito mesocórticolímbico, para mediar las propiedades reforzantes de los psicoestimulantes (Boutrel y col., 2008). La administración aguda o crónica de psicoestimulantes produce cambios adaptativos en la expresión de genes que codifican para los distintos elementos del SOE, ya sean receptores o péptidos opioides endógenos en áreas del circuito dopaminérgico mesocórticolímbico. Particularmente, existen evidencias que han indicado una activación región-específica del sistema μ -opioide inducido por cocaína. Se han encontrado aumentos a largo término en los niveles del ARNm que codifica para los receptores μ -opioides (Leri y col., 2006) e incrementos en la activación del receptor dentro del NAc (Azaryan y col., 1998; Unterwald y col., 2001) luego de la exposición crónica a cocaína. En cuanto a los receptores δ -opioides, los niveles de ARNm no se encontraron modificados luego una administración crónica de la droga. Sin embargo, se observó una internalización de dichos receptores en el NAc, 48 h después de un paradigma de administración crónica de cocaína (Ambrose-Lanci y col., 2008),

sugiriendo una regulación ejercida por la droga sobre el sistema δ -opioide a nivel de transducción de señales, en lugar de modificar los niveles de expresión del receptor.

En consistencia con estas observaciones bioquímicas, evidencias farmacológicas han demostrado la participación de los receptores opioides en el desarrollo y/o expresión del fenómeno de sensibilización. La administración sistémica de antagonistas opiáceos no selectivos [naltrexone y naloxone (NX)], D-Phe-*cyc* (Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen)-Thr-NH₂ (CTAP), un antagonista selectivo μ -opioide y naltrindole un antagonista selectivo δ -opioide, impiden el desarrollo y/o expresión del fenómeno de sensibilización en ratas (Heiderberer y col., 1996; Shippenberg y col., 1995; Sala y col., 1995; Schroeder y col., 2007) y ratones (Kim y col., 1997; Hummel y col., 2004; 2006).

Aunque esta evidencia farmacológica establece un rol para los receptores opioides en la sensibilización inducida por cocaína, los estudios que utilizan ratones *knockout* para el receptor μ -opioide no fueron concluyentes en cuanto a la influencia de este receptor en el desarrollo del fenómeno (Yoo y col., 2012). Además, ningún estudio publicado hasta la actualidad aclara cuál de los péptidos opioides endógenos, a través de su actividad agonística sobre los receptores μ - y δ -opioides, estaría involucrado en la sensibilización a cocaína. En relación con esto, resultados de nuestro laboratorio demostraron un aumento en los niveles de met-enkefalina en el NAc y CPf luego de una abstinencia a largo plazo de anfetamina (Assis y col., 2006; 2009; 2011). De manera similar, otros autores reportaron incrementos sustanciales del ARNm de proencefalina luego de una exposición crónica a cocaína en áreas del circuito mesocorticolímbico relevantes para la expresión del fenómeno de sensibilización (Spangler y col., 1997; Crespo y col., 2011; Hurd y col. 1992, Branch y col., 1992; Mathiu-Kia y Benson, 1998, Steiner y col., 1993), sugiriendo un rol potencial de este neuropéptido en la modulación de dicho proceso. A pesar de todas estas evidencias y aquellas que demuestran la influencia ejercida por encefalina sobre la neurotransmisión dopaminérgica en el circuito mesolímbico (Latimer y col., 1987; Kalivas y Duffy 1988; Daugé y col., 1992; Dourmap y col., 1990; Hipólito y col., 2008), hasta la fecha no se ha establecido la contribución específica de este neuropéptido en la plasticidad neuronal que sustenta la sensibilización inducida por cocaína observada a largo término.

OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Considerando 1) las pruebas indirectas que utilizan herramientas farmacológicas o genéticas (antagonistas o ratones *knockout* para los receptores opioides) que sugieren un papel para encefalina en la sensibilización a cocaína, 2) estudios publicados de nuestro y otros laboratorios que demuestran un aumento en los niveles de encefalina en áreas mesocorticolímbicas asociadas con la expresión de la sensibilización inducida por psicoestimulantes después de una abstinencia a corto plazo (Spangler., 1997; Hurd y col., 1992) así como a largo plazo a la droga (Assis y col., 2009; 2011) y 3) el rol modulador ejercido por encefalina sobre la neurotransmisión dopaminérgica mesolímbica (Latimer y col., 1987; Kalivas y Duffy 1990b; Daugé y col., 1992; Dourmap y col., 1990; 1994; Hipólito y col., 2008), presumimos que el sistema encefalinérgico es necesario para establecer las neuroadaptaciones inducidas por cocaína que sustentan la sensibilización conductual a la droga observada a largo término.

OBJETIVOS

Objetivo general

Encefalina media sus acciones fisiológicas uniéndose a los receptores δ - y μ -opioides (Mansour y col., 1995b). Estudios farmacológicos han demostrado un papel para dichos receptores en el desarrollo y la expresión de la sensibilización a cocaína (Shippenberg y Heidbreder, 1995; Sala y col., 1995; Heidbreder y col., 1996; Schroeder y col., 2007; Kim y col., 1997; Hummel y col., 2004). No obstante, estudios que utilizan herramientas genéticas (ratones *knockout* para los receptores μ -opioides) no fueron concluyentes en cuanto a la participación de los receptores opioides en la sensibilización a cocaína (Yoo y col., 2012). A pesar de esta evidencia, hasta ahora la literatura no ha explicado la influencia de encefalina en la plasticidad neuronal inducida por cocaína que sustenta la sensibilización a largo término inducida por la droga.

El **objetivo general** de este trabajo de tesis doctoral fue estudiar el papel del sistema encefalinérgico en la sensibilización conductual inducida por cocaína y el desarrollo de neuroadaptaciones clave en áreas del circuito mesocorticolímbico asociadas con la expresión de este fenómeno.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Determinar la activación del sistema encefalinérgico luego de un tratamiento con cocaína que induce sensibilización en áreas del circuito mesocorticolímbico relevantes para la expresión del fenómeno.

Numerosas evidencias han demostrado una desregulación de los diversos componentes del SOE tras la administración aguda o crónica de psicoestimulantes en áreas del circuito mesocorticolímbico. Específicamente, datos publicados de nuestro laboratorio, mostraron un incremento persistente en los niveles de met-enkefalina en NAc y CPf luego de un tratamiento agudo con amfetamina que induce sensibilización (Assis y col., 2009; 2011). En esta línea de evidencia, otros autores reportaron incrementos en el ARNm que codifica para proenkefalina en NAc y estriado dorsal luego de un tratamiento crónico con cocaína (Hurd y col., 1992; Spangler y col., 1997; Przewlocka y col., 1995; Mathieu-Kia y Besson, 1998). Motivados por estos antecedentes y con el fin de determinar si cocaína produce alteraciones a largo término en los niveles de met-enkefalina, se estudiaron los niveles de expresión del neuropéptido en áreas del circuito mesocorticolímbico relevantes para la expresión del fenómeno de sensibilización la sensibilización inducida por cocaína, luego de un tratamiento crónico con la droga.

Determinar una activación a largo término del sistema encefalinérgico luego de la exposición a cocaína, resulta crucial para establecer una posible relación entre las alteraciones inducidas por cocaína en dicho sistema y la plasticidad neuronal inducida por la droga.

Objetivo específico 2: Estudiar la participación del sistema encefalinérgico en la sensibilización conductual a cocaína.

La influencia de enkefalina sobre las áreas clave involucradas en el fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína es un evento que no ha sido explicado y podría constituir un mecanismo importante para la modulación de este proceso. A fin de estudiar la participación del sistema encefalinérgico en la sensibilización conductual inducida por cocaína se utilizaron animales que carecen del gen que codifica para la proenkefalina o *knockout* (KO) y animales de genotipo salvaje o *wild type* (WT) como

control. Ambos grupos de animales fueron sometidos a un paradigma de tratamiento para inducir sensibilización a los efectos estimulantes motores de cocaína y se evaluó la expresión del fenómeno al re-exponer ambos genotipos de animales a una dosis desafío con la droga.

Objetivo específico 3: Evaluar la participación del sistema encefalinérgico en los cambios pre-sinápticos asociados al fenómeno de sensibilización a cocaína: liberación de dopamina en NAc y expresión del DAT en la membrana.

El fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína observado a largo término, está generalmente asociado a un incremento en los niveles extracelulares de dopamina en el NAc (Kalivas y Stewart, 1991; Kalivas y Duffy, 1993), siendo este evento uno de los mecanismos pre-sinápticos clave que ha sido propuesto para explicar la expresión del fenómeno. Conforme a este antecedente y con el fin de investigar uno de los posibles eventos neuroquímicos que puedan explicar mecanísticamente los resultados conductuales obtenidos durante el desarrollo del objetivo 2, se evaluó la sensibilización a las propiedades estimulantes de cocaína sobre la liberación de dopamina, así como los niveles de expresión del DAT en el NAc de animales WT y KO.

Objetivo específico 4: Evaluar la influencia del sistema encefalinérgico sobre los eventos moleculares clave asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína: expresión de receptores AMPA, TrkB, activación de ERK1/2 , el factor de transcripción CREB y niveles de BDNF en áreas del circuito mesocorticolímbico relevantes para la expresión del fenómeno.

Diversos autores han propuesto que las señales dopaminérgicas y glutamatérgicas que convergen a nivel del NAc, son las responsables de generar los cambios moleculares estables en el tiempo que subyacen el fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína, y además, contribuyen de manera determinante al desarrollo de adicción a la droga. Dichos eventos moleculares están asociados funcional y temporalmente entre sí: el incremento en la liberación de dopamina y glutamato, así como también en los niveles de BDNF, inducidos luego de la exposición a cocaína, disparan la activación de una cadena de señalización intracelular que culmina en la inducción de la expresión génica y cambios en la excitabilidad de la membrana neuronal de las células del NAc.

Este objetivo está enfocado a establecer el posible rol del sistema encefalinérgico como mediador de los cambios moleculares a largo plazo asociados al fenómeno de sensibilización, estableciendo así una asociación entre la activación de estos eventos en áreas claves del circuito mesocorticolímbico y la ocurrencia del fenómeno. Con este fin se determinaron los niveles de pERK2, pCREB, expresión de receptores AMPA en superficie celular, niveles de BDNF y pTrkB en áreas del circuito mesocorticolímbico relevantes para expresión de la sensibilización a cocaína de animales WT y KO sometidos a un esquema de tratamiento que induce sensibilización a la droga.

Objetivo específico 5: Demostrar mediante intervenciones farmacológicas (administración de NX) la participación del sistema opioide endógeno en el desarrollo y expresión del fenómeno de sensibilización a cocaína sobre parámetros conductuales y moleculares.

Como fue descripto, se ha demostrado que antagonistas de receptores μ - y δ -opioides atenúan el desarrollo y/o la expresión del fenómeno de sensibilización inducida por psicoestimulantes (Menkens y col., 1992; Sala y col., 1995; Magendzo y Bustos, 2003). Sin embargo, estos estudios solo evalúan la sensibilización conductual y no indagan los mecanismos neurobiológicos que puedan explicar la reversión del fenómeno luego de la administración del antagonista opiáceo.

Teniendo en cuenta que encefalina se une con alta afinidad a receptores μ - y δ -opioides (Mansour y col., 1995b), que NX ha demostrado suprimir la sensibilización a cocaína (Kim y col., 1997) y determinadas observaciones clínicas (Comer y col., 2013; Mooney y col., 2013; Schmitz y col., 2009) que muestran la utilidad de los antagonistas opiáceos en el tratamiento de la adicción a la cocaína, el último objetivo fue determinar si NX (un antagonista opiáceo no selectivo), podría revertir los cambios neuroplásticos inducidos por cocaína en áreas del circuito mesocorticolímbico relevantes para la expresión de la sensibilización en ratones WT, de una manera similar a la observada en los ratones KO luego de cocaína y, a su vez, ampliar mecanísticamente las evidencias mencionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales.

Se utilizaron ratones de genotipo salvaje o *wild type* (WT) y ratones que carecen del gen de la proencefalina (KO) los cuales fueron gentilmente donados por el Dr. Andreas Zimmer del Instituto de Psiquiatría Molecular de Bonn, Alemania. Los animales KO fueron enviados a Argentina por el servicio aéreo World Courier en 2007. Los mismos fueron alojados en el bioterio de la Dra. Beatriz Caputto del CIQUIBIC-CONICET, acondicionado para mantener a los animales en condiciones libres de patógenos específicos (S.P.F).

La generación de los ratones KO fue descrita previamente por König y col., (1996). Para generar este genotipo de animales se reemplazó el extremo 5' del exón 3, el cual contiene todas las secuencias codificantes para proencefalina, por un constructo denominado PGK-*neo* (*cassette* de resistencia a neomicina) lo que da por resultado un exón truncado, no codificante (Figura 12). En los animales homocigotos no se detectaron niveles de encefalina y en los animales heterocigotos se detectó menor contenido del neuropéptido en comparación a los niveles observados en los ratones WT (Figura 13).

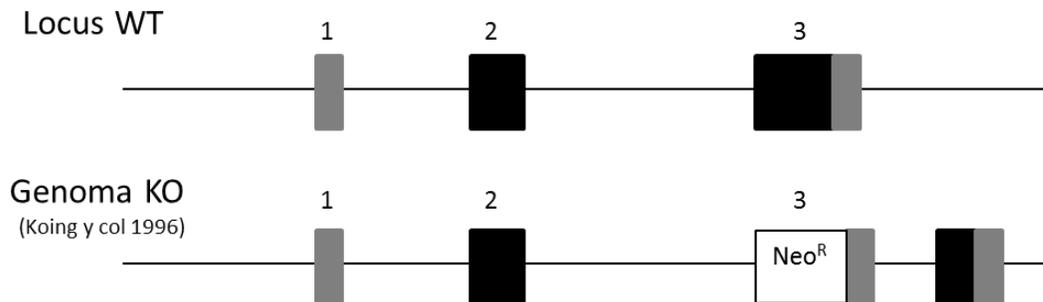


Figura 12. Locus *wild type* para proencefalina y la estrategia utilizada por König y col., (1996) para obtener ratones deficientes en proencefalina. Los intrones están representados por líneas continuas, los exones codificantes por recuadros negros y los no codificantes por recuadros grises.

La cepa KO fue cruzada en un trasfondo genético C57BL/6 durante al menos 10 generaciones y mantenidos en esta condición cruzando los animales KO con ratones C57BL/6 cada tres o cuatro generaciones. Los animales WT como KO utilizados en este estudio fueron obtenidos a través de cruces de los animales heterocigotos. Se emplearon como controles para todos los experimentos ratones WT nacidos en la misma camada

(*littermates*) que los ratones KO. Para los experimentos de NX, los ratones C57BL/6 fueron adquiridos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, Argentina.

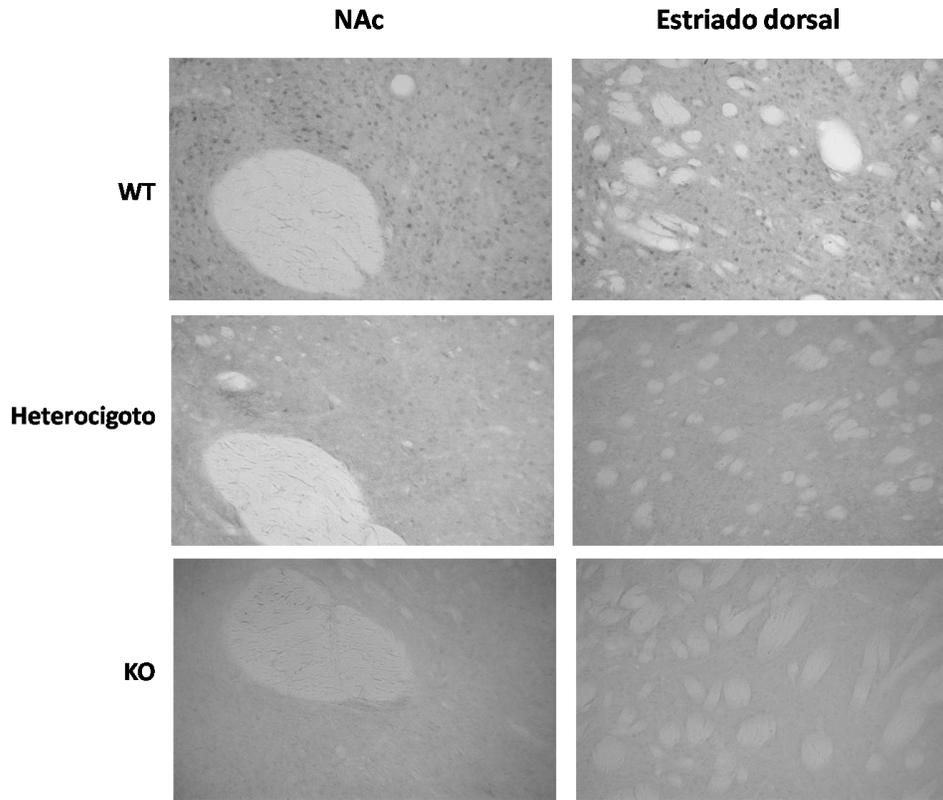


Figura 13. Microfotografías (20x) mostrando la tinción inmunohistoquímica para encefalina donde se evidencia la presencia y/o ausencia de expresión de dicho neuropéptido en las áreas analizadas: NAc (panel izquierdo) y estriado dorsal (panel derecho) de animales WT, heterocigotos (Penk +/-) y KO.

Los ratones macho de entre 8 y 12 semanas de edad fueron alojados cuatro por jaula a una temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad ($55\pm 10\%$) constantes en habitaciones con un ciclo de luz/oscuridad controlado de 12 h (la luz entre las 8:00 a.m. y las 8:00 p.m.). Los animales dispusieron de comida y agua *ad libitum*. Todos los ratones fueron genotipificados rutinariamente para identificar los genotipos WT, KO y los animales heterocigotos según el protocolo provisto por el Instituto de Psiquiatría Molecular de Bonn. Posteriormente fueron seleccionados para cada experimento por edad, genotipo y sexo. Los animales fueron habituados a su nuevo ambiente durante 1 semana antes de iniciar todos los procedimientos experimentales. Todos los experimentos fueron desarrollados durante el ciclo de luz (horario de 9:00 a.m. y 4:00 p.m.) y los procedimientos experimentales se

manejaron de acuerdo con la Guía del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, aprobado por el Comité de las Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Genotipificación de animales WTy KO.

Biopsias

Antes de que los animales cumplan el mes de vida, se procedió a realizar una biopsia a los mismos para extraer subsecuentemente el ADN de las mismas y determinar el genotipo de cada ratón. La biopsia consistió en cortar aproximadamente 4-5 mm de la punta de la cola del ratón con un bisturí desinfectado en alcohol 70 %. Las muestras se colocaron en un microtubo conteniendo *buffer* fosfato salino (PBS 1X) estéril (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄.2H₂O 10 mM, KH₂PO₄ 2,0 mM, pH= 7,4) y se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.

Extracción del ADN

Se agregaron 400 µl de *buffer* de lisis (NaCl 200mM, Tris 100 mM, EDTA 5 mM, SDS 0.2%, pH=8) y 12 µl de Proteinasa K (20 mg/ml, Fermentas) a cada muestra de biopsia en un microtubo estéril. Las muestras fueron incubadas en estufa a 55°C toda la noche (12-18 hs). Al día siguiente, se agregaron a las muestras 170 µl de NaCl 0,6M para precipitar proteínas agitando vigorosamente por 15 seg y se centrifugaron a 12.000 rpm. Se tomaron 400 µl del sobrenadante resultante y se agregó igual volumen de etanol al 95% v/v mezclando suavemente por inversión. Posteriormente, las muestras se incubaron 20 min a -20°C para favorecer la precipitación del ADN. A continuación, se centrifugaron durante 10 min a 10.000 rpm, se descartó el sobrenadante conservando el precipitado de ADN (*pellet*). Luego de esto, se agregaron 400 µl de etanol 70% v/v para lavar el *pellet* de ADN. Se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante y conservando el *pellet* de ADN. Se dejó secar el *pellet* por 5 min a temperatura ambiente. Los extractos de ADN se mezclaron con 50µl de *buffer* Tris-EDTA (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH=8) y se incubaron a 65°C durante 10 min para disolver el ADN. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificaron muestras conteniendo 4 μL de ADN extraído de cada animal (diluído previamente 1:10) en presencia de 10 μL de dNTPs 10 mM (Life Technology), 10 μL de oligonucleótidos 10 μM , 0,75 μL de MgCl_2 1,5 mM y 1,25 unidades de polimerasa Taq ADN (Life Technology). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne) con los parámetros de amplificación especificados en la Tabla 2.

Paso	Temp °C	Tiempo	Ciclos
1	95	2 min	1X
2	95	30 seg	35X
	60	45 seg	
	72	1 min	
3	72	5 min	1X
4	4	-	-

Tabla 2. Parámetros de amplificación utilizados para determinar el genotipo de los animales WT, Heterocigotos (Penk +/-) o KO.

Finalmente, los productos de la PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con Syber-safe (Invitrogen). Para amplificar los fragmentos correspondientes al genotipo WT (700 bp) y KO (550 bp) (Figura 14) se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (Sigma Aldrich):

Proencefalina *common*: 5'-GCATCCAGGTAATTGGCAGGAA-3';

Proencefalina *knockout* (neoRL): 5'-CAGCAGCCTCTGTTCCACATACA-3';

Proencefalina *wildtype*: 5'-TCCTTCACATTCCAGTGTGC -3'

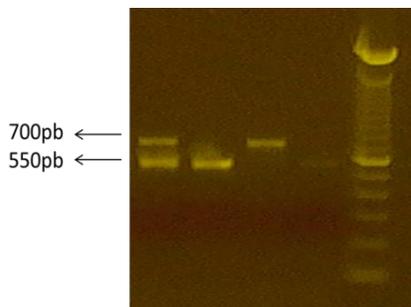


Figura 14. Análisis de los geles de agarosa mostrando el producto de PCR obtenido para los animales heterocigotos (Carril 1), KO a 550pb (Carril 2) y WT a 700pb (Carril 3).

Drogas.

Se utilizó clorhidrato de cocaína (Laboratorios Verardo, Buenos Aires, Argentina) y NX dihidroclorhidrato (Sigma Aldrich) disueltas en una solución salina isotónica estéril (NaCl 0,9%), la cual también fue usada como vehículo para las inyecciones control.

Todos los tratamientos se realizaron entre las 10 a.m. y las 12 a.m. a modo de evitar la influencia del ritmo circadiano sobre la sensibilización conductual inducida por psicoestimulantes (Abarca y col., 2002).

Tratamientos

Reproduciendo el esquema utilizado por De Jong y col.,(2009) los ratones macho de la cepa C57B6/J de entre 8 y 12 semanas de vida WT y KO fueron asignados al azar a dos grupos de tratamiento: Grupo vehículo y Grupo cocaína. El paradigma de sensibilización consistió en una fase de tratamiento (días 1-9), donde se les administró diariamente a los animales una dosis de vehículo o cocaína 15mg/kg. Luego de un intervalo de abstinencia, los animales recibieron una dosis desafío con vehículo (día 14), y dos dosis desafío con cocaína 7,5 mg/Kg (días 15 y 21) (Figura 15). En el primer día de la fase de tratamiento, se realizaron registros de actividad locomotora y estudios moleculares (niveles de fosforilación de ERK2) en los animales de los diferentes grupos experimentales (Figura 15 y 16).

Para los experimentos con NX, se utilizó el mismo esquema de tratamiento, con la excepción de que 15 min antes de cada inyección de cocaína los animales fueron administrados con una dosis de 1 mg/kg s.c. de NX o vehículo durante la fase de tratamiento (Figura 16). Para realizar los estudios neuroquímicos y moleculares se optó por administrar solo una dosis desafío con cocaína transcurridos 21 días desde el comienzo del tratamiento. Esta elección se realizó en base a los resultados obtenidos en los experimentos conductuales.

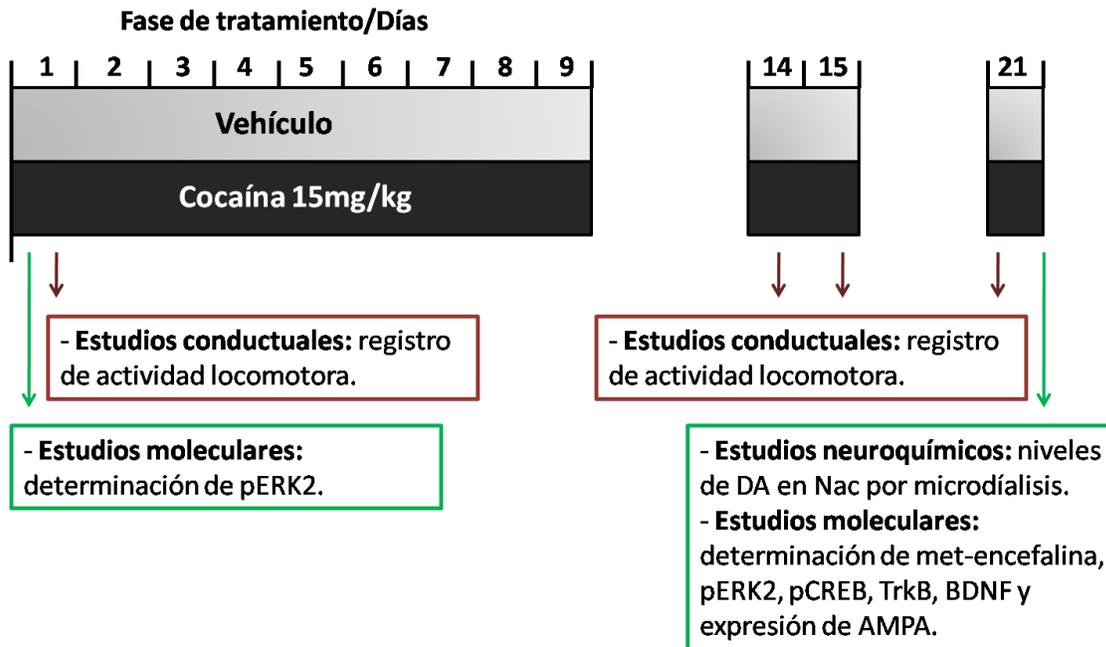


Figura 15. Esquema de tratamiento utilizado para inducir sensibilización conductual a cocaína y evaluar los mecanismos neuroquímicos y moleculares asociados al fenómeno en los animales WT y KO.

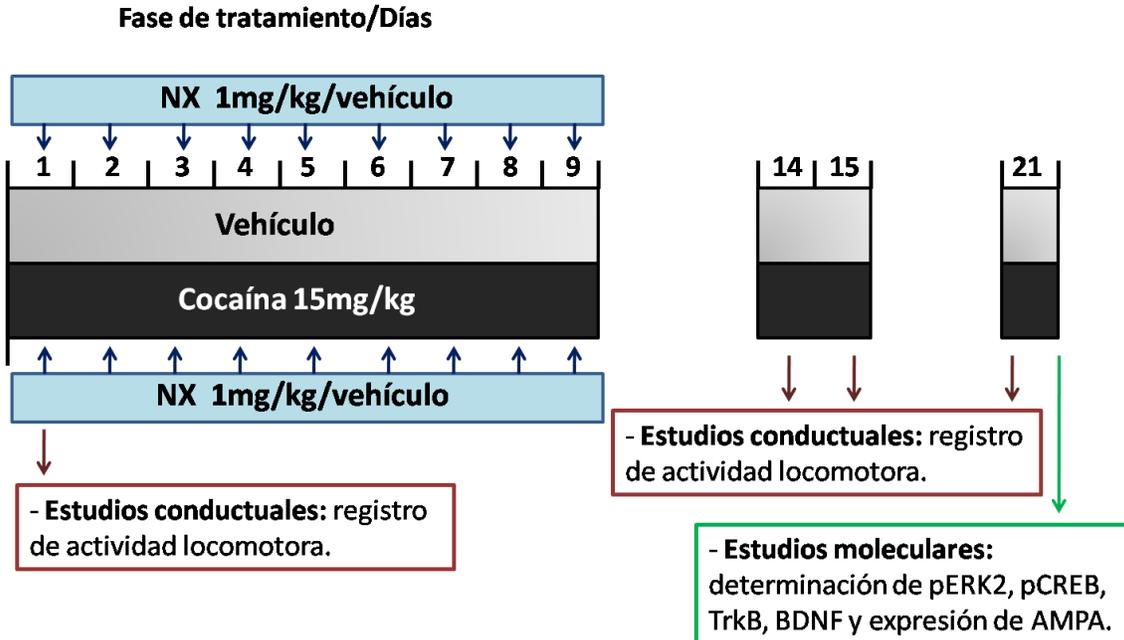


Figura 16. Esquema de tratamiento utilizado para evaluar el efecto de NX sobre la sensibilización conductual inducida por cocaína y eventos moleculares asociados.

ESTUDIOS CONDUCTUALES

Registro de actividad locomotora

Para medir la actividad locomotora se utilizaron cajas individuales de actividad locomotora (40 cm de diámetro), construidas en plástico opaco con dos fotoceldas transversales posicionadas 1 cm sobre el piso y acopladas a una computadora (Figura 17). La intersección de cada haz de luz de la fotocélula resulta en el registro de una cuenta. Los animales fueron colocados en forma individual en las cajas de registro durante 2 hs para su habituación, posteriormente fueron inyectados con vehículo o cocaína (7,5 mg/kg i.p.) y su actividad locomotora fue monitoreada con un sistema de video-cámara durante 30 min registrándose las cuentas totales resultantes. Los datos se expresaron como el promedio de cuentas totales registradas en 30 min en cada grupo experimental.

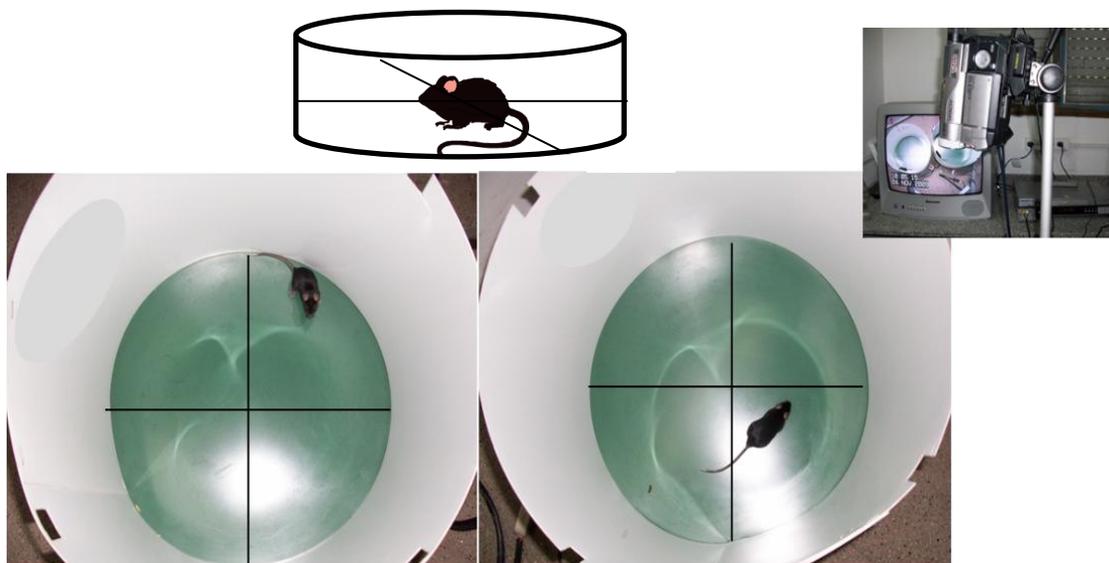


Figura 17. Cajas de actividad locomotora utilizadas para los estudios conductuales.

ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS

Fundamento de la técnica de microdiálisis *in vivo*

La técnica de microdiálisis permite cuantificar la liberación de neurotransmisores o sus metabolitos en animales vivos y despiertos. El método consiste en la implantación de

una sonda de diálisis (*probe*) en el área cerebral a estudiar. La sonda de microdiálisis está formada por dos porciones de sílica muy finas recubiertas por agujas metálicas a través de las cuales ingresa y sale a un flujo constante una solución similar al líquido cefalorraquídeo (Figuras 18 y 19). En su extremo la sonda posee una membrana de diálisis que permite la difusión pasiva de sustancias a favor de su gradiente de concentración desde el líquido extracelular presente en el área donde se colocó la sonda y el líquido cefalorraquídeo artificial que circula en el interior de la misma (Figura 18 y 19). Los dializados son colectados y posteriormente analizados para determinar los niveles de neurotransmisores.

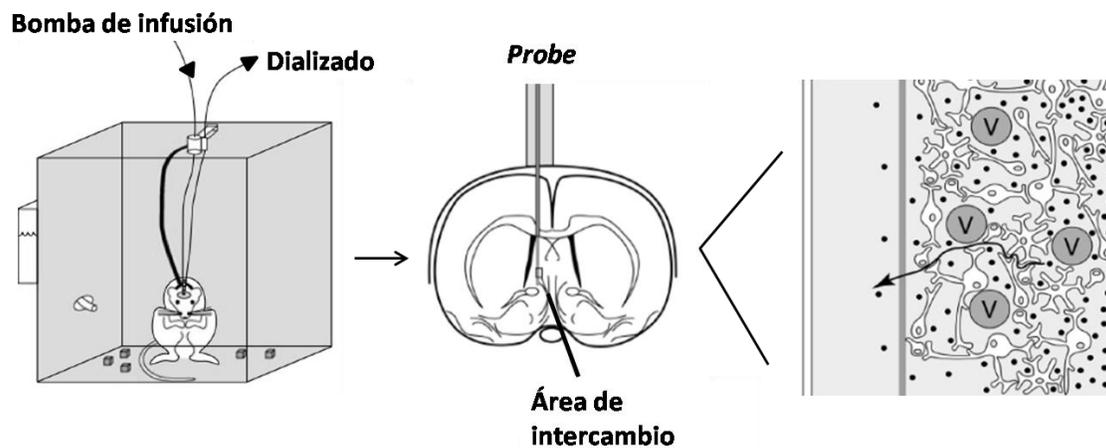


Figura 18. Esquema ilustrando el fundamento de la técnica de microdiálisis *in vivo*. (Modificado de Chefer y col., 2009).

Construcción de las sondas (*probes*) para microdiálisis

Las *probes* de diálisis concéntricas fueron manufacturadas en el laboratorio con membranas de diálisis de AN69 (Hospal, Bologna Italia) siguiendo el diseño de DiChiara y col., (1993b) con modificaciones menores (Paccioni y col., 2007) y adaptadas para ratón. La membrana de diálisis fue sellada con pegamento atóxico en su extremo superior e inferior, para impedir el fenómeno de diálisis excepto en la zona de contacto con el área de estudio. La porción activa de la membrana para el NAc de ratón es de 1 mm (Figura 19).

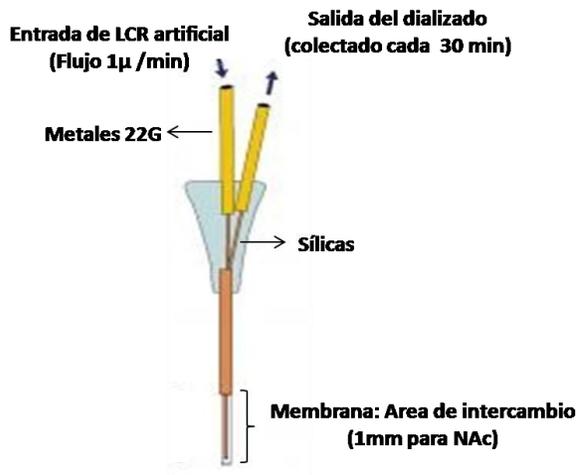


Figura 19. Sonda de microdiálisis. En la figura se indica los tubos de sílica recubiertos por metales 22G a través de los cuales se perfundió la solución de Ringer a flujo constante. Se muestra el área de intercambio igual a 1mm para NAc de ratón.

Cirugías

Transcurridos 20 días desde el inicio del tratamiento crónico con cocaína o vehículo, los animales WT y KO fueron anestesiados con una solución de ketamina/xilazina (Kensol, Lab König, Buenos Aires, Argentina) disueltas en PBS 1X en una dosis de 55 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente. Posteriormente fueron colocados en un aparato estereotáxico Stoelting con un adaptador para ratón. El cráneo fue expuesto y los orificios necesarios para colocar las *probes* de microdiálisis fueron realizados con un torno de uso dental. Las cánulas de diálisis fueron implantadas unilateralmente en el NAc según las coordenadas del Atlas de cerebro de ratón de Franklin y Paxinos, (2007): AP: +1.2; ML: +/- 1.0; DV: -4.9. Para fijar las cánulas al cráneo se utilizó cemento dental acrílico. Una vez implantadas las cánulas, se suturó la piel que recubre el cráneo con pegamento.

Microdiálisis *in vivo*

Luego de la cirugía los animales fueron colocados en cajas plásticas individuales donde se recuperaron en el transcurso de 18 a 22 hs (Figura 19). Luego de este tiempo, las *probes* implantadas en los animales fueron conectadas a una bomba de infusión a través de un *swivel* utilizando tubos muy finos (*tubbings*) (Figuras 18 y 20) y la membrana de diálisis fue perfundida con solución de Ringer (NaCl 145 nM, KCl 4.0 nM, CaCl₂ 2.2 nM) a un

flujo constante de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las muestras de dializado fueron colectadas cada 30 min. Para determinar los niveles basales de dopamina de cada animal se obtuvieron 4 muestras consecutivas que no variaron entre sí más del 10%. Una vez obtenidas estas muestras, los animales fueron inyectados con vehículo, donde se colectaron muestras de dializado por 1,5 hs. Subsecuentemente, los animales fueron inyectados con cocaína (7,5 mg/kg) y se colectaron muestras de dializado por 3 hs adicionales.

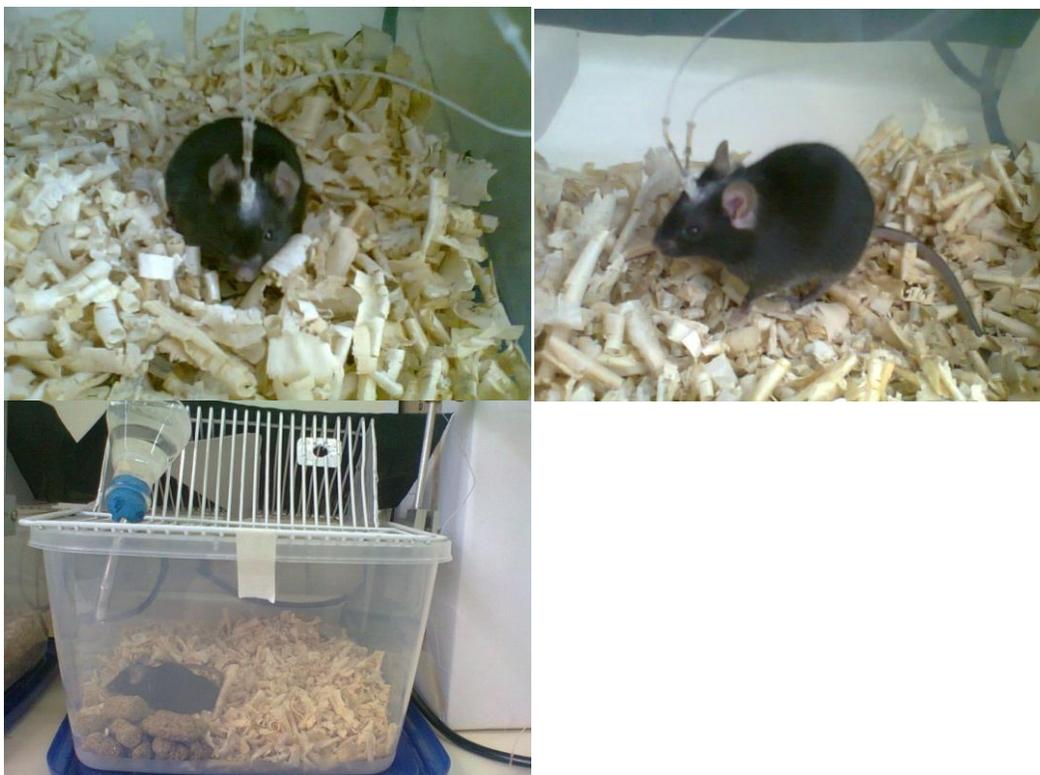


Figura 20. Microdialisis *in vivo* en ratones WT y KO. Las fotografías fueron tomadas durante el desarrollo de los experimentos de la presente tesis en el Laboratorio de Microdialisis del IFEC-CONICET.

Determinación de dopamina por cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

Las dializados colectados fueron inyectados (volumen de inyección= 20 μL) en un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) con Detección Electroquímica (ECD) equipado con una columna de fase reversa RP 18 (C18, 125-4.6 mm, 5 mm de tamaño de partícula) y un detector coulométrico (ESA Coulochem II, Bedford, MA, USA) para la separación y detección de dopamina. Los potenciales de los electrodos que se utilizaron fueron: celda de guarda (+350 mV), electrodo 1: +175 mV (oxidación),

electrodo 2: -175 mV (reducción). La fase móvil utilizada (50 mM NaH₂PO₄; 5 mM Na₂HPO₄; 0.1 mM EDTA-Na; 0.5 mM octilsulfonato de sodio y 12% de metanol; pH= 5.5) fue filtrada, degasificada y bombeada (ESA Chemlmsford, MA, USA modelo 528) a un flujo de 1ml/min a través de la columna. Bajo estas condiciones se observó rutinariamente un límite de detección para dopamina de 5 fmoles. Los picos fueron registrados y las alturas medidas con un sistema para análisis de datos cromatográficos EZ Chrome Elite. Estos valores fueron comparados utilizando una curva de estándares externos. Los datos se graficaron como % de cambio respecto a los valores basales obtenidos.

Histología

Finalizada la microdiálisis los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral al 16% p/v y sometidos a una perfusión transcardíaca con solución salina (NaCl 0.9%) y solución fijadora (Paraformaldehído al 4%). Los cerebros fijados fueron conservados en sucrosa al 30% hasta su procesamiento. Para ello, los mismos fueron cortados en un criostato (Leica CM1510S, Alemania) en secciones coronales de 40 µm. Dichas secciones fueron teñidas con violeta de cresilo y observadas en un microscopio óptico para la verificación de la correcta implantación de cánulas en el área de interés, en referencia al atlas de ratón de Franklin y Paxinos (2007). Solo fueron incluidos en los experimentos los animales implantados correctamente.

ESTUDIOS MOLECULARES

Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Perfusión y preparación del tejido.

Después de 30 min de la dosis desafío en el día 21 del tratamiento, los ratones fueron sometidos a una perfusión transcardíaca con 30 mL de solución salina/heparina (NaCl 0,9%/15.000 UI/L de heparina) y solución fijadora (4% de paraformaldehído, en *buffer* fosfato 0,1M, pH= 7,2). Finalizada la perfusión, se extrajeron los cerebros y se fijaron en la misma solución de fijación durante toda la noche a 4°C y posteriormente fueron conservados en sucrosa al 30% durante 24-72 hs hasta su procesamiento. Los cerebros se cortaron en secciones coronales de 30 µm con un criostato (Leica CM1510S, Alemania) y se recolectaron en PBS 1X para la determinación de met-enkefalina por

inmunohistoquímica, o en su defecto, se cortaron en secciones coronales de 10 μm y montaron en portaobjetos gelatinizados para la determinación de BDNF por inmunofluorescencia.

Inmunohistoquímica para la determinación de met-enkefalina

La determinación de met-enkefalina se realizó en las secciones de 30 μm de espesor usando el método de avidina-biotina-peroxidasa estándar (kit de Vectastain Elite; Vector Laboratories) tal como fue descrito previamente por Meilandt y col., (2008). Después de la reducción de la actividad de peroxidasa endógena con H_2O_2 al 0,3% en PBS 1X y el bloqueo de las uniones no específica del tejido con solución de albúmina sérica bovina (BSA 5% en PBS 1X/Tritón 0,01% v/v), las secciones flotantes se incubaron durante 16-18 hs con un anticuerpo contra met-enkefalina monoclonal (1:500; Millipore) a 4°C en un agitador circular. Posteriormente se realizaron 3 lavados del tejido con 5mL de PBS 1X (3x15 min). El anticuerpo primario se detectó con un anticuerpo secundario biotinilado anti-rabbit (1:500; Jackson Laboratories). Luego de 3 lavados con 5 mL de PBS 1X (3x15 min), el tejido se incubó con 5mL del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) en solución de albúmina sérica bovina (1% BSA en PBS 1X/Tritón X-100 0,1% v/v). Paso siguiente, se realizaron 3 lavados del tejido con PBS 1X (3x15 min). Para la visualización de las marcas se utilizó diaminobencidina (Sigma Aldrich) como cromógeno, para lo cual las secciones de tejido fueron incubadas durante 3 min con solución de diaminobencidina al 0,05% en PBS 1X y H_2O_2 al 0,0006% v/v como sustrato de reacción. Las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados, y cubreobjetos con DPX (Sigma Aldrich). En algunas secciones de cerebro se realizó una contraincubación con violeta de cresilo.

Cabe aclarar que si bien la proteína precursora pro-enkefalina también da lugar al pentapéptido leu-enkefalina, el cual posee gran similitud estructural y funcional con met-enkefalina, ambos neuropéptidos coexisten en las mismas neuronas y se utilizan ambos, indistintamente, como marcadores de estructuras conteniendo enkefalina. Luego del procesamiento de pro-enkefalina, se originan cuatro copias de met-enkefalina y solo una de leu-enkefalina, debido a esto resulta dificultoso determinar solo leu-enkefalina ya que la mayoría de los anticuerpos comerciales tienen reactividad cruzada con met-enkefalina (McCollum y col., 2012), siendo este último neuropéptido el marcador el ideal para detectar

estructuras conteniendo encefalina y la actividad del sistema encefalinérgico luego de un tratamiento específico.

Inmunofluorescencia para la determinación de BDNF

Para la detección de BDNF por inmunofluorescencia, las secciones del cerebro (10 μm de espesor) montadas en portaobjetos gelatinizados se incubaron con suero normal de cabra (10% v/v en PBS 1X) durante 2 hs a temperatura ambiente para bloquear uniones no específicas del tejido. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con un anticuerpo anti-BDNF (1:200; Santa Cruz-546) durante 40 hs a 4°C y se lavaron con PBS1X-Tritón 0,3 % v/v (6 x5 min) antes de incubar con el anticuerpo secundario (anti-rabbit 1:250 Alexa 568) durante 2 hs a temperatura ambiente. Después de este paso, las secciones se lavaron con PBS -Tritón 0,3 % v/v (6x5 min) y se secaron a 4°C durante 10 min.

Adquisición de imágenes y cuantificación

Las células que expresan met-encefalina fueron contadas manualmente, desconociendo la condición experimental de cada muestra, en imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico de campo (Leica DM 4000 B) con un aumento de 20x. Las células positivas para met-encefalina se identificaron y se contaron utilizando el programa Image J (NIH). El conteo de células se realizó en el NAc y el estriado dorsal, seleccionando tres láminas de cada área y cuantificando ambos hemisferios en cada caso. Posteriormente se obtuvo un promedio final del conteo para cada área y condición experimental. Se utilizó un tamaño de área idéntico (0,35 mm^2) y el conteo se realizó de la misma forma para cada región del cerebro. La expresión de BDNF se midió como la intensidad de fluorescencia por célula. Las imágenes del NAc, estriado dorsal, CPf y ATV fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 con una magnificación de 20x. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia en 30 células individuales seleccionadas al azar en ambas áreas. Se utilizó un tamaño de área idéntico (0,35 mm^2) y la cuantificación de intensidad de fluorescencia/célula se realizó en 3 láminas de cada área cerebral y en forma bilateral para cada condición experimental. Finalmente se obtuvo un promedio de intensidad de fluorescencia por área y condición experimental. El programa utilizado para

cuantificar fluorescencia fue el mismo que el utilizado para cuantificar encefalina (ImageJ NIH). Los datos se expresaron como % de cambio respecto al grupo control.

Preparación de homogenatos cerebrales y fraccionamiento sub-celular

Transcurridos 21 días desde el comienzo del tratamiento, los animales fueron inyectados con una dosis desafío con cocaína (7,5 mg/kg) y 30 min después fueron sacrificados por dislocación cervical. Los cerebros se extrajeron rápidamente y el NAc, estriado dorsal, CPf y el hipocampo fueron disecados. Las estructuras obtenidas de dos animales, disecadas en forma bilateral, fueron agrupadas en una misma muestra a los fines de obtener suficiente material para cada experimento.

Para determinar la fosforilación de ERK2 y TrkB, el tejido se homogeneizó en *buffer* RIPA (NaCl 150 mM, NP40 0,1 %, desoxicolato de sodio 0,5 %, dodecil sulfato de sodio 0,1 %, Tris 50 mM, pH =7,5) con inhibidores de proteasas (1µg/ml de aprotinina, 1µg/ml de leupeptina, 1µg/ml de pepstatina A y 100 µg/ml de fluoruro de fenilmetanosulfonilo, PMSF) y fosfatasa (1 mM de NaVO₄). Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se combinó con ¼ de volumen de *buffer* Laemmli (SDS 4 %, glicerol 20 %, β-mercaptoetanol 10 %, Tris 125 mM, azul de bromofenol 0,01%, pH= 6,8). Posteriormente, las muestras fueron hervidas a 100°C durante 5 min. Se utilizaron alícuotas de los sobrenadantes para la cuantificación de proteínas por el micro-método de Bradford utilizando un kit de ensayo de Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Para determinar la fosforilación de ERK2 y CREB en los extractos nucleares, se realizó un fraccionamiento subcelular descrito previamente por Gorosito y col., (2008). El NAc y el estriado dorsal se homogeneizaron en *buffer* de extracto citoplasmático (Hepes 10 mM pH 7,5, KCl 60 mM, EDTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM, NaVO₄ 1 mM, 100 µg/ml PMSF, Nonidet P40 0,075 %) y se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 min a 4°C para sedimentar los núcleos. Los sobrenadantes resultantes se utilizaron como extracto citoplasmático. Los precipitados conteniendo las fracciones nucleares se resuspendieron en *buffer* de extracto nuclear (Tris HCl 20 mM, 420 mM NaCl, 60 mM KCl, EDTA 1 mM, NaVO₄ 1 mM, PMSF 1 mM, glicerol 25 %v/v, pH= 8,0), fueron incubados en hielo por 15min y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes resultantes

se utilizaron como extracto nuclear. Alícuotas de cada muestra fueron utilizados para la cuantificación de proteínas totales de acuerdo con el micro-método de Bradford utilizando un kit de ensayo de Bio-Rad. La especificidad de los extractos nucleares fue determinada reprobando las membranas donde se sembraron los mismos con un anticuerpo anti-histona (Santa Cruz Biotechnology), y la especificidad del extracto citoplasmático se determinó reprobando las membranas donde se sembraron los mismos con un anticuerpo contra LIM-quinasa 1 (LIMK-1) (Santa Cruz Biotechnology) (Figura 21). Los homogeneizados totales y los extractos nucleares de cada área se sometieron a inmunotransferencia de proteínas para determinar los niveles de fosforilación de ERK2 (anti-pERK1/2 thr 202/tyr 204 1:1000; Cell Signaling Technology) y ERK2 total (anti-ERK1/2 1:2000; Cell Signaling Technology) utilizando los anticuerpos específicos respectivos para cada proteína. Si bien existen dos isoformas de la proteína ERK (ERK1 de 44kDa y ERK2 de 42kDa) y el anticuerpo utilizado en este estudio reconoce ambas, se cuantificó solo ERK2 ya que es la enzima funcionalmente importante para los efectos inducidos cocaína y es la isoforma que presenta una mayor activación tras la administración del psicoestimulantes (Valjent y col., 2005).

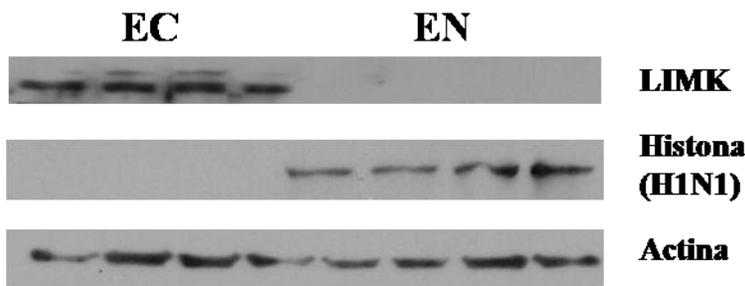


Figura 21. Análisis de inmunotransferencia de proteínas del extracto citoplasmático (EC) y nuclear (EN). Se evidencia inmunoreactividad de LIMK-1 en el EC e inmunoreactividad de la histona H1N1 en el EN. Se utilizó actina como control para ambos extractos.

Los niveles de fosforilación de CREB (pCREB) se determinaron en los extractos nucleares usando un anticuerpo anti-pCREB Ser 133 (1:500; Cell Signaling Technology) y CREB total (1:1000; Cell Signaling Technology). Los niveles de TrkB fosforilado (pTrkB) y TrkB se determinaron utilizando un anticuerpo contra pTrkB (1:1000; Epitomics) y contra TrkB (1:1000; Santa Cruz Biotechnology). Los niveles de pCREB y pERK2 se

normalizaron a la proteína total (ERK2 y CREB, respectivamente), y los niveles de pTrkB y TrkB *full length* (TrkB fl) se normalizaron a β -tubulina (1:5000; Biomedical Tech). Cabe aclarar que el anticuerpo anti-TrkB utilizado reconoce a la proteína TrkB fl (150kDa) la cual corresponde a la forma completa del receptor TrkB. La proteína TrkB T (100 kDa) corresponde a una isoforma truncada del receptor, la cual no contiene el dominio intracelular, y no se cuantificó en este estudio.

Biotinilación de proteínas en superficie celular: fundamento

La determinación de proteínas en la membrana plasmática se realizó utilizando el reactivo de biotinilación, sulfosuccinimidobiotin (NHS-Biotina), este reactivo se une a la porción NH₂- terminal de las proteínas expresadas en la superficie celular, las cuales posteriormente son inmunoprecipitadas con avidina, la cual se encuentra contenida en perlas de agarosa. Paso siguiente, las proteínas inmuno-precipitadas son eluidas de las perlas de agarosa y se procede a su determinación por inmunotransferencia.

Determinación de la expresión del receptor AMPA (subunidad GluR1).

Las determinaciones de la expresión del receptor AMPA se realizó según lo descrito previamente por Esparza y col., (2012). Transcurridos 21 días desde el comienzo del tratamiento, los animales fueron inyectados con una dosis desafío con cocaína (7,5mg/kg) y 30 min después fueron sacrificados por dislocación cervical. El cuerpo estriado dorsal y NAc fueron disecados. Las áreas disecados fueron transferidas a un microtubo conteniendo 1mL de sulfo NHS - biotina (0,3 mg/ml) en PBS 1X y se incubaron durante 1 h a 4°C, se descartó el reactivo en exceso y se colocó 1mL de *buffer* Tris-glicina (Tris 10mM, glicina 100 mM) para finalizar la reacción de la biotina libre (5 min), seguidamente se realizaron 3 de lavados con PBS 1X (3x5 min). Posteriormente, el NAc y estriado dorsal se homogeneizaron en 200 μ l de *buffer* RIPA. Se añadieron 100 μ l adicionales de *buffer* de homogeneización para obtener 300 μ l de homogenizado total. Los mismos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 min para sedimentar la fracción insoluble. Para la fracción total de GluR1 (fracción de superficie + fracción interna), 50 μ l del sobrenadante se mezclaron con 12,5 μ l de *buffer* Laemmli 4x. Las proteínas de superficie biotiniladas en el sobrenadante restante (200 μ l) se inmunoprecipitaron con 50 μ l de perlas agarosa (50% p/v) conteniendo

avidina inmovilizada en su superficie (ImmunoPure Immobilized Avidin; Pierce) durante 2 horas a 4°C. Las perlas se sedimentaron centrifugando las muestras a 2500 rpm, 150 µl del sobrenadante resultante (fracción interna) se mezcló con 37,5 ml de *buffer* Laemmli 4X y fueron hervidas por 5 min. Las perlas que sedimentaron se lavaron tres veces con PBS 1X (3x 5 min) frío y las proteínas biotiniladas se eluyeron mediante incubación con 50uL de *buffer* Laemmli 2X a 100°C durante 5 min (fracción de superficie). La fracción de superficie y la fracción total (superficie + fracción interna) se sometieron a inmunotransferencia cuantitativa de proteínas utilizando un anticuerpo anti-GluR1 (1:300, Millipore). Se definió a los receptores AMPA (subunidad GluR1) asociados a la membrana plasmática como la fracción de superficie normalizada a la fracción total (superficie + fracción interna), la cual representa el total de receptores AMPA (subunidad GluR1) presente en cada muestra antes de precipitar la fracción de superficie con las perlas de avidina.

Determinación de la expresión de DAT.

Se evaluó el contenido de DAT en membrana plasmática de sinaptosomas según lo descrito por Salvatore y col., (2003). El NAc y el estriado dorsal se disecaron y se homogeneizaron en 200uL de solución de sucrosa fría (0,32 M sacarosa, 5 mM bicarbonato de sodio, pH 7,4) se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 min a 4°C y los sobrenadantes resultantes se centrifugaron a 20.000 rpm durante 15 min a 4°C. El pellet resultante que contiene los sinaptosomas crudos se resuspendieron en 100uL de *buffer* Krebs (NaCl 118 mM , KCl 4,7 mM , KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, Na₂EDTA 25 mM , CaCl₂ 1,7 mM, glucosa 10 mM, ácido ascórbico 100 µM) y se incubaron durante 1h a 4°C en 500 uL de de sulfo-NHS-biotina (1,5 mg/ml) en *buffer* PBS Ca/Mg (NaCl 138 mM , KCl 2,7 mM , KH₂PO₄ 1,5 mM , Na₂HPO₄ 9,6 mM , MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH= 7,3). Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 8.000 rpm durante 4 min a 4°C. Para finalizar la reacción de la biotina libre, el pellet resultante se resuspendió en 1 ml de glicina 100 mM. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 8.000 rpm durante 4 min a 4°C, y los pellets resultantes se lavaron tres veces en 1 ml de *buffer* PBS Ca/Mg en hielo. El pellet final se lisó en 300 µl de *buffer* Tritón X-100 (Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1,0 % de Tritón X-100, 1 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de leupeptina, 1 pepstatina µM, 250

μM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Los lisados (300 μL) se centrifugaron a 21.000 rpm durante 20 min a 4°C. El sedimento se descartó, y 100 μL del sobrenadante se almacenó a -20°C para la determinación de la inmunoreactividad total de DAT (fracción total). El sobrenadante restante se incubó con 100 μl de perlas de avidina-agarosa al 50 % durante 2 horas a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 17.000 rpm durante 4 min a 4°C y los sobrenadantes (que contienen la fracción no biotinilada o fracción interna) se almacenaron a -20°C. Los pellets conteniendo las perlas de avidina resultantes (proteínas de la superficie celular o fracción de superficie) se lavaron tres veces en 1 ml de *buffer* Triton X-100 (3x5 min) y se centrifugaron a 17.000 rpm durante 4 min a 4°C. Las proteínas biotiniladas fueron eluidas mediante incubación con 50 μL de *buffer* Laemmli durante 20 min a temperatura ambiente. La fracción de superficie y fracción total se sometió a inmunotransferencia cuantitativa para DAT usando un anticuerpo anti-DAT (1/500; Millipore). Se definió al contenido de DAT asociados a la membrana plasmática como la fracción de superficie normalizada a la fracción total (fracción de superficie + fracción interna), la cual representa el total de DAT presente en cada muestra antes de precipitar la fracción de superficie con las perlas de avidina.

Controles de los experimentos de biotinilación

La especificidad de la fracción de superficie celular de los experimentos de biotinilación se realizó determinando el contenido de la proteína citoplasmática LIMK-1, tanto en la fracción de superficie celular, así como también en la fracción interna o citoplasmática y la fracción total de las muestras de NAc y estriado dorsal provenientes de los experimentos de biotinilación. Como se puede observar en la Figura 22, hay inmunoreactividad de LIMK-1 en las fracciones internas y totales de ambas áreas cerebrales pero no en la fracción de superficie celular, indicando que el método de biotinilación que se utilizó no incluye las proteínas citoplasmáticas y es eficiente en la determinación de proteínas de membrana.



Figura 22. Análisis de inmunotransferencia de proteínas de la fracción interna o citoplasmática, la fracción de superficie celular y la fracción total. Solo se evidencia inmunoreactividad de LIMK-1 en la fracción citoplasmática y total.

Inmunotransferencia de proteínas

Luego de los procedimientos de fraccionamiento subcelular, homogeneización de áreas cerebrales y biotilación de proteínas de superficie celular, se evaluaron los niveles de las proteínas correspondientes mediante la técnica de inmunotransferencia. Las muestras de proteínas (30µg) correspondiente a cada grupo experimental, fueron sembradas y separadas en un sistema de geles SDS-PAGE (BioRad Laboratories) con geles de poliacrilamida al 12% (para proteínas ERK2 y CREB) y al 10% (para GluR1, DAT y TrkB). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Fluoruro de polivinilideno, Amersham Hybond-P, General Electric). Se bloquearon las uniones inespecíficas con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en *buffer* T-TBS (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Tween 20 0,01%, pH, 7,6). Posteriormente se incubaron durante toda noche a 4°C con los anticuerpos primarios apropiados. Paso siguiente, se lavaron las membranas con T-TBS (4x15 min). Los anticuerpos fueron detectados incubando las membranas de PVDF (1 h a temperatura ambiente) con anticuerpos secundarios (según la especie del anticuerpo primario utilizado previamente) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (1:2000, Jackson Laboratories). El revelado se realizó por la técnica de quimioluminiscencia con luminol, ácido cumárico como catalizador y H₂O₂ como sustrato de reacción. El revelado se plasmó en placas radiográficas (AGFA). La densidad óptica de las bandas fue analizada utilizando el programa Image J (NIH) y los resultados normalizados respecto al grupo control.

En todos los casos se corroboró la especificidad de los anticuerpos primarios utilizados, determinada por la presencia de una banda única la cual se corresponde con el peso molecular de la proteína estudiada (datos no mostrados), coincidiendo con lo reportado en la literatura (Mattson y col., 2005; Salvatore y col., 2000; Esparza y col., 2013; Crooks y col., 2010)

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de todos los experimentos fueron analizados utilizando el programa STATISTICA 7.1. El análisis estadístico de los datos conductuales y bioquímicos se realizó utilizando un análisis de varianza (*test* de ANOVA) de dos vías con los siguientes factores: genotipo (WT o KO) y tratamiento (vehículo o cocaína). El análisis estadístico de los resultados neuroquímicos también se realizó aplicando un test de ANOVA de dos vías (tratamiento y tiempo), considerando el factor tiempo como medida repetida (lecturas cada 30 min). Para evaluar el efecto estimulante de una administración aguda de cocaína sobre la liberación de dopamina en los animales KO, se realizó un *test-t* comparando los niveles de dopamina determinada a los tiempos previo y posterior a la administración de la dosis desafío con la droga (180 y 210min desde el comienzo de la microdiálisis, respectivamente). Los efectos significativos señalados por el test de ANOVA fueron analizados posteriormente empleando un test de Fisher-LSD (para los resultados bioquímicos y neuroquímicos) o de Bonferroni (para los resultados conductuales). En todos los casos estas significancias fueron señaladas como * para un $p < 0,05$; ** para un $p < 0,01$ y los efectos de una determinada condición (genotipo, pre-tratamiento o tratamiento) se indicaron utilizando los símbolos # o §.

RESULTADOS

1. Efecto de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización conductual sobre los niveles de met-enkefalina en áreas del circuito mesocotilímbico relevantes para la expresión del fenómeno.

Con el fin de determinar si cocaína produce alteraciones a largo término en los niveles de met-enkefalina, ratones C57BL/6J fueron sometidos a un esquema de tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización a la droga y posteriormente se cuantificaron por inmunohistoquímica los niveles de expresión de dicho neuropéptido en el NAc y estriado dorsal (ver Figura 15, pág. 52 de la sección Materiales y métodos).

Como puede observarse en la Figura 23A y B, los animales que recibieron un tratamiento crónico con cocaína mostraron un marcado incremento en los niveles de met-enkefalina en el NAc y estriado dorsal respecto a lo observado en el grupo control. El incremento en los niveles de met-enkefalina en ambas áreas cerebrales asociado a un tratamiento crónico con cocaína, es independiente de la administración de una dosis desafío con la droga transcurridos 21 días desde el inicio del tratamiento (Grupo COC-VEH y COC-COC Figura 23A y B). Cabe señalar que no se evidenciaron incrementos en los niveles de met-enkefalina luego de la administración aguda de cocaína en ambas áreas cerebrales (Grupo VEH-COC Figura 23A y B).

Un test de ANOVA de dos vías, evidenció un significativo efecto del tratamiento sobre los niveles de met-enkefalina en el estriado dorsal ($F_{(1,14)}=25,65$; $p<0,01$) y en el NAc ($F_{(1,16)}=22,20$; $p<0,01$) sin mostrar ningún efecto con respecto a la administración de la dosis desafío con droga.

Se utilizó como control negativo de la inmunohistoquímica ratones que carecen del gen que codifica para la proenkefalina (KO Penk^{-/-}) (Figura 23A).

Utilizando una contra-tinción del tejido con violeta de cresilo, se determinó la localización intra-celular de met-enkefalina (Figura 23A). La marca de met-enkefalina colocalizó con el pericarion celular, revelado tras la tinción con violeta de cresilo. Esta observación concuerda con lo reportado por Garzón y Pickel, (2002).

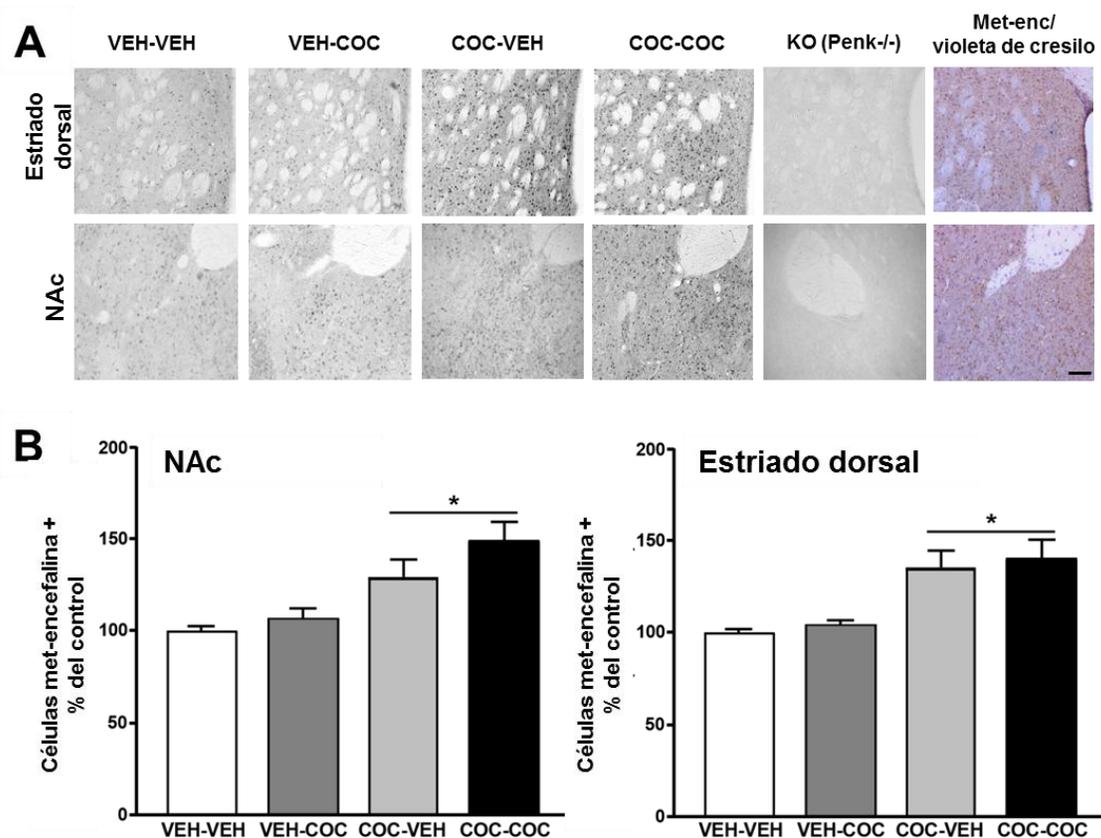


Figura 23. Niveles de met-enkefalina en estriado dorsal y NAc luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización. **A**) Microfotografías (20x) de secciones coronales del estriado dorsal (panel superior) y NAc (panel inferior) mostrando la tinción inmunohistoquímica para met-enkefalina en los distintos grupos experimentales. Se utilizaron ratones KO (Penk^{-/-}) como control negativo. Secciones de cada área cerebral fueron sometidas a una contra-tinción con violeta de cresilo para revelar la localización celular del neuropéptido. Barra de escala: 100 μ m. **B y C**) Gráfico derivado de la cuantificación del número de células positivas para met-enkefalina (n^océlulas positivas/0,35mm²) en el estriado dorsal y NAc de los distintos grupos de experimentales. Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 5 experimentos independientes. * p<0,01 indica diferencia significativa entre tratamientos (vehículo y cocaína).

Conclusión parcial: Un tratamiento crónico con cocaína es capaz de producir una activación a largo término del sistema encefalinérgico en áreas del circuito mesocóticolímbico relevantes para la expresión del fenómeno de sensibilización inducido por la droga

2. Participación del sistema encefalinérgico en el fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína.

Los incrementos persistentes en los niveles de met-enkefalina inducidos por cocaína en áreas del circuito mesocorticolímbico relevantes para la expresión del fenómeno de sensibilización evidenciados durante el desarrollo del objetivo 1, sugirieron una posible influencia del neuroéptido en dicho proceso. Con el fin de determinar la participación del sistema encefalinérgico en el fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína, ratones WT y KO para el gen de la proencefalina fueron sometidos a un paradigma de tratamiento para inducir sensibilización a los efectos estimulantes motores de la droga y se evaluó la actividad locomotora de ambos genotipos al re-exponerlos a una dosis desafío de la misma transcurridos 15 y 21 días desde el inicio del tratamiento (ver Figura 15, pág. 52 de la sección Materiales y métodos).

A los fines de determinar el efecto de una dosis aguda de cocaína en ambos genotipos de animales (WT y KO), se midió la actividad locomotora en respuesta a una dosis de vehículo y cocaína (15mg/kg) en el primer día de la fase de tratamiento. Los registros conductuales mostraron un marcado incremento en la actividad locomotora de los ratones WT y KO en respuesta a la dosis de cocaína, en comparación a lo observado en los ratones de ambos genotipos que recibieron una dosis de vehículo.

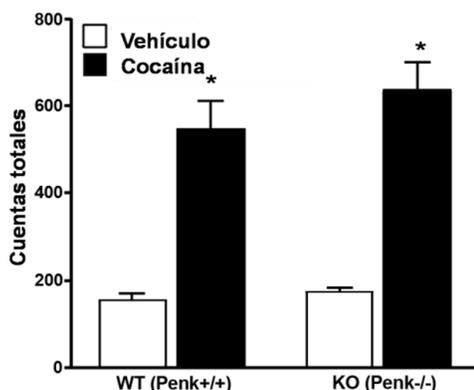


Figura 24. Actividad locomotora de los animales en respuesta a una dosis aguda de cocaína (15mg/kg) o vehículo. Los datos están representados como el promedio de cuentas totales/30min \pm EEM (WT-VEH n=9, WT-COC n=9, KO-VEH n=9, KO-COC n=9 animales/grupo). * $p < 0.05$ comparado con WT-VEH y/o KO-VEH.

Este resultado indica que la ausencia del gen de proencefalina no afectó la respuesta estimulante motora de cocaína tras la administración aguda de la droga (Figura 24). Un test de ANOVA de dos vías, mostró un significativo efecto del tratamiento en la actividad locomotora de los animales ($F_{(1,31)} = 86,80$; $p < 0.01$), sin evidenciar efecto del genotipo o interacción entre las dos variables estudiadas (genotipo y tratamiento).

Las Figuras 25A y B muestran la actividad locomotora de los animales en respuesta a una dosis desafío con cocaína (7,5mg/Kg i.p.) en el día 15 y 21 desde el inicio del tratamiento crónico con vehículo o cocaína en ambos genotipos de ratones. Los animales WT que recibieron un tratamiento crónico con cocaína, mostraron un marcado incremento en la actividad locomotora en respuesta a una dosis desafío con la droga (expresión de la sensibilización conductual), en comparación a lo observado en los animales WT tratados crónicamente con vehículo tras recibir la misma dosis desafío. La expresión de la sensibilización conductual se observó en los animales WT tratados crónicamente con cocaína luego de recibir una dosis desafío con la droga transcurridos ya sean 15 o 21 desde el inicio tratamiento, demostrando una persistencia del fenómeno de sensibilización en dichos animales. A diferencia de lo observado en los animales WT, los animales KO tratados crónicamente con cocaína no expresaron el fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína (Fig. 25A y B). No se observaron diferencias significativas en la actividad locomotora de los animales KO que recibieron un tratamiento crónico con cocaína tras recibir a una dosis desafío con la droga transcurridos 15 días desde el comienzo del tratamiento, respecto a lo observado en los animales KO tratados crónicamente con vehículo tras recibir la misma dosis desafío (Figura 24A) (tratamiento $F_{(1,31)} = 38,32$; $p < 0,01$ - interacción $F_{(1,31)} = 10,74$; $p < 0,01$). Realizando un análisis *post hoc* (Bonferroni), se evidenció una marcada diferencia en la actividad locomotora entre los animales WT que recibieron una administración crónica de cocaína con los animales WT tratados crónicamente con vehículo ($p < 0,01$) y los animales KO tratados crónicamente ya sea con vehículo o cocaína ($p < 0,05$), tras recibir una dosis desafío con la droga (Figura 25A). Diferencias similares se observaron cuando los animales recibieron una dosis desafío con cocaína transcurridos 21 desde el inicio del tratamiento (tratamiento $F_{(1,31)} = 16,28$; $p < 0,01$ -interacción $F_{(1,31)} = 13,13$; $p < 0,01$). Un análisis *post hoc* (Bonferroni), evidenció una diferencia significativa en la actividad locomotora entre los animales WT que

recibieron una administración crónica de cocaína con los animales WT tratados crónicamente con vehículo ($p < 0,01$) y los animales KO tratados crónicamente ya sea con vehículo o cocaína ($p < 0,05$) (Figura 25B).

Es importante destacar que la actividad locomotora en respuesta a una dosis desafío con vehículo (día 14) (Figura 25A) fue similar en todos los grupos de tratamiento y notablemente más baja que la observada tras administrar la dosis desafío con cocaína los días 15 y 21 en todos los grupos de animales. Este efecto indica que la respuesta sensibilizada observada tras la administración de la dosis desafío con cocaína en los animales WT los cuales expresaron el fenómeno, no puede ser atribuida a una respuesta condicionada. Realizando un test de ANOVA de dos vías, no se observaron efectos significativos del tratamiento o genotipo sobre la actividad locomotora de los animales en este día (tratamiento $F_{(1,31)} = 0,89$; NS; genotipo $F_{(1,31)} = 1,39$ NS).

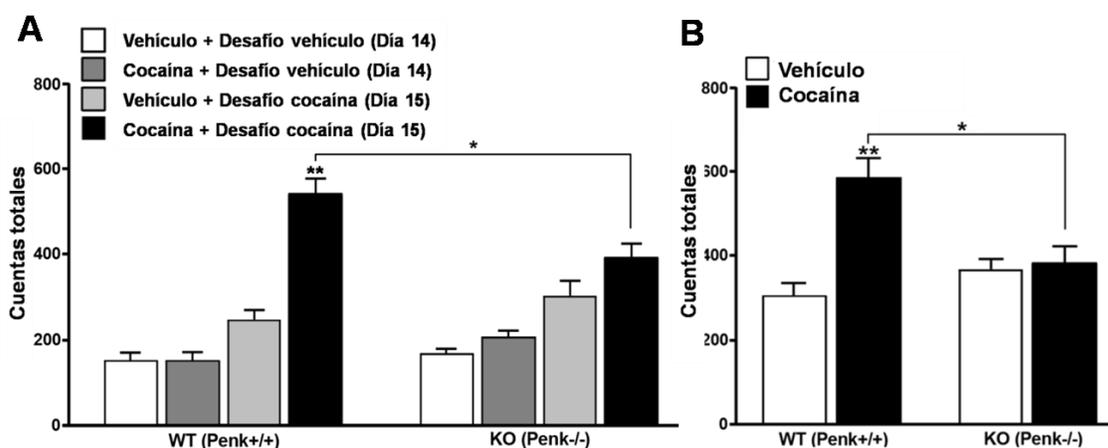


Figura 25. Actividad locomotora en respuesta a una dosis desafío con vehículo en el día 14, una dosis desafío con cocaína 7,5mg/Kg en el día 15 (A) y 21 (B). Los datos están representados como el promedio de cuentas totales/30min \pm EEM (WT-VEH $n=9$, WT-COC $n=9$, KO-VEH $n=9$, KO-COC $n=9$ animales/grupo ** $p < 0,01$ comparando WT-COC vs. WT-VE * $p < 0,05$ indica diferencia significativa comparado con WT-VEH y/o KO-VEH/COC).

Conclusiones parciales: El sistema encefalinérgico facilita el desarrollo de la sensibilización conductual inducida por cocaína, ya que la ausencia del mismo afecta la expresión de este fenómeno.

3. Participación del sistema encefalinérgico en los cambios pre-sinápticos asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína: liberación de dopamina en NAc y expresión del transportador de dopamina (DAT).

3.1 Participación del sistema encefalinérgico en la sensibilización al efecto estimulante de cocaína sobre la liberación de dopamina en el NAc.

Con el fin de investigar uno de los posibles eventos neuroquímicos que puedan explicar mecanísticamente los resultados conductuales obtenidos durante el desarrollo del objetivo 2, se evaluó la influencia del sistema encefalinérgico en la sensibilización a las propiedades estimulantes de cocaína sobre la liberación de dopamina. Para abordar este objetivo, ratones WT y KO fueron sometidos a un paradigma de tratamiento crónico con cocaína para inducir sensibilización y utilizando la técnica de microdiálisis *in vivo* se evaluaron los niveles extracelulares de dopamina en el NAc de ambos genotipos al re-exponerlos a una dosis desafío de la droga transcurridos 21 días desde el inicio del tratamiento (ver sección Materiales y métodos, Figura 15). Además, para determinar que no existan posibles alteraciones en la acción primaria de cocaína a nivel del NAc de los animales KO, se evaluaron los niveles extracelulares de dopamina en respuesta a una dosis aguda de la droga en dichos animales.

De acuerdo a evidencias anteriores (Kalivas y Stewart, 1991; Kalivas y Duffy, 1993), una dosis desafío con cocaína administrada a los animales WT tratados crónicamente con la droga, indujo una respuesta sensibilizada en la liberación de dopamina en el NAc revelado por un marcado aumento de los niveles extracelulares del neurotransmisor en dicha área cerebral, en comparación a lo observado en los animales WT que recibieron un tratamiento crónico con vehículo (Figura 26A). Un test de ANOVA de dos vías (tratamiento y tiempo) con muestras repetidas en el tiempo, mostró una interacción entre las variables estudiadas sobre los niveles de dopamina en el NAc de los animales WT ($F_{(12,156)} = 1,92$; $p < 0,05$). Realizando un análisis *post hoc* de Fisher se evidenció un significativo incremento en el porcentaje de liberación de dopamina después de la administración de la dosis desafío con cocaína (7,5mg/kg) en los animales WT tratados crónicamente con la droga, respecto a los niveles observados en los animales WT tratados

crónicamente con vehículo (Figura 26A). A diferencia de la respuesta sensibilizada observada en los ratones WT, los animales KO no evidenciaron sensibilización al efecto estimulante de cocaína sobre la liberación de dopamina en el NAc (Figura 26B). El mismo test estadístico utilizado para el análisis de los niveles de dopamina en los animales WT, no arrojó ninguna interacción entre las variables estudiadas (tratamiento y tiempo) sobre los niveles de dicho neurotransmisor en el NAc de los animales KO ($F_{(12,156)} = 0,32$; NS).

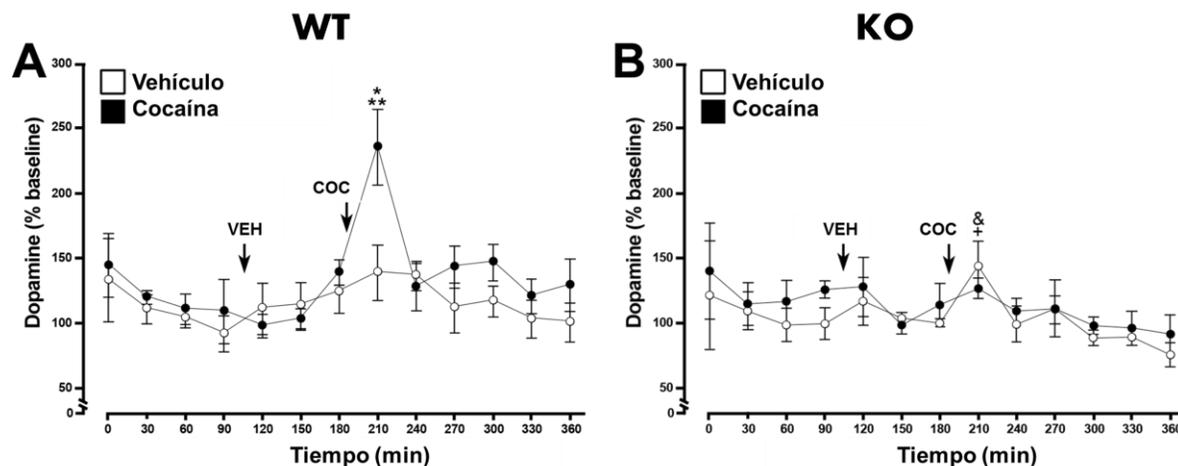


Figura 26. Efecto de una dosis desafío con vehículo y cocaína (7,5mg/kg) sobre los niveles extracelulares de dopamina presente en dializados obtenidos por microdialísis *in vivo* en el NAc de ratones **A)** WT y **B)** KO. Las flechas indican la administración de la dosis desafío de vehículo y cocaína (7,5mg/kg) a los 120 min y 210 min desde el inicio de la microdialísis, respectivamente. Todos los valores están expresados como la media \pm EEM y representados como porcentaje de aumento respecto de los niveles basales de dopamina de cada grupo de tratamiento (WT-VEH n= 9, KO-VEH n= 7, WT-CO n= 8, KO-CO n= 9 animales/grupo) ** $p < 0,01$ comparado con los niveles basales de dopamina; * $p < 0,05$ comparando el efecto de la dosis desafío con cocaína (210min) entre los grupos WT y KO. & y + $p < 0,01$, comparando los niveles de dopamina obtenidos antes (180min) y después (210min) de la administración de la dosis desafío con cocaína en los animales KO-VEH/COC respectivamente (test-*t*).

Posteriormente, se realizó un test de ANOVA de dos vías para analizar conjuntamente el efecto de las variables genotipo y tratamiento sobre los niveles de dopamina en el NAc de los animales WT y KO después de la administración de la dosis desafío con cocaína (correspondiente al tiempo 210 min desde el inicio de la microdialísis). Aplicando este test, se evidenció un efecto del genotipo ($F_{(1,26)} = 7,21$; $p < 0,05$) y una interacción entre las variables estudiadas ($F_{(1,26)} = 8,32$; $p < 0,01$) sobre los niveles del

neurotransmisor en el NAc luego de la administración de la dosis desafío con cocaína en los animales WT y KO. Realizando un análisis *post hoc* de Fisher se evidenció un incremento significativo en los niveles de dopamina en el NAc de los animales WT tratados crónicamente con cocaína 30min después de recibir la dosis desafío con la droga en comparación a lo observado en los restantes grupos experimentales ($p < 0,01$). Cabe destacar que la administración de una dosis desafío con vehículo 120 min luego del inicio de la microdiálisis, no produjo incrementos significativos en los niveles extracelulares de dopamina en el NAc de los diferentes grupos experimentales con respecto a los valores basales.

Por otra parte, los resultados indican que el efecto estimulante de cocaína sobre la liberación de dopamina luego de una administración aguda de la droga no se ve afectado en los animales KO (Figura 26B, ver 210 min. post-cocaína). Un test-*t* realizado para comparar los niveles de dopamina antes y después de la administración de la dosis desafío con cocaína (180 y 210 min desde el inicio de la microdiálisis, respectivamente) en los animales KO, demostró que existe un efecto en la liberación de dopamina luego de la inyección aguda de la droga en dicho genotipo de animales. Este efecto se observa en los animales KO tratados crónicamente ya sea con vehículo o cocaína (KO-VEH $t\text{-test}_{12}=2,79$, $p < 0,01$; KO-COC $t\text{-test}_{12}=4,78$, $p < 0,01$), indicando que la acción primaria de la droga en el NAc de los animales KO no se encuentra afectada.

Los niveles basales de dopamina fueron similares en los distintos grupos experimentales (Tabla 3). Los mismos fueron obtenidos de las muestras de dializado colectadas previo a la administración de las dosis desafío con vehículo en los diferentes grupos de tratamientos y expresados como fmoles de dopamina/20 μ L.

GRUPO	DA (fmoles/20 μ L)
WT-VEH	41,8 \pm 4,8
WT-CO	45,9 \pm 6,0
KO-VEH	45,0 \pm 5,7
KO-CO	47,0 \pm 5,7

Tabla 3. Niveles basales de dopamina expresados en fmoles/20 μ L y representados como la media \pm EEM para los 4 grupos de tratamiento.

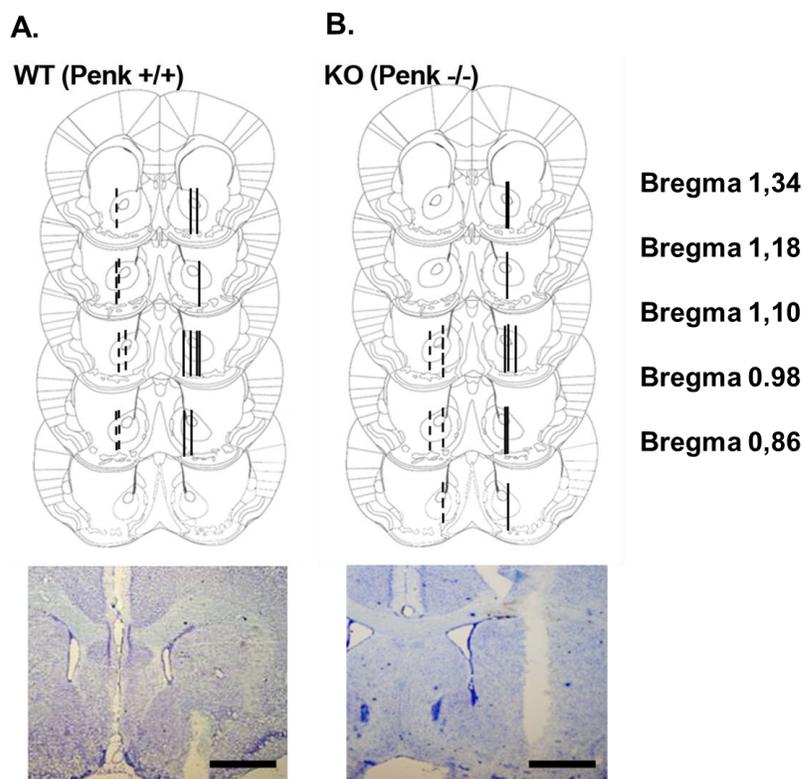


Figura 27. Diagramas representativos que ilustran las ubicaciones de las cánulas de diálisis entre las coordenadas bregma 1,34mm y 0,86mm para los animales **A)** WT y **B)** KO. Las líneas entrecortadas representan al grupo vehículo y las líneas continuas representan al grupo cocaína correspondiente a cada genotipo. Al pie de cada diagrama se muestran secciones coronales (40µm) de cerebro de ratón teñidas con violeta de cresilo mostrando la ubicación de la cánula de diálisis en el NAc en los animales WT (izquierda) y KO (derecha). Barra escala: 1mm.

3.2 Niveles del transportador de dopamina (DAT) en el NAc y estriado dorsal de ratones WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización.

A los fines de descartar alteraciones en los niveles del DAT en los animales KO que puedan interferir con el mecanismo de acción primaria de cocaína, y afectar la funcionalidad del sistema dopaminérgico de manera diferente a los WT, se evaluaron los niveles de dicha proteína en el NAc y estriado dorsal proveniente de ambos genotipos luego del tratamiento con la droga.

Los ratones WT y KO fueron sometidos a un paradigma de tratamiento crónico con cocaína para inducir sensibilización y se evaluaron por Western blot los niveles de DAT en

el NAc y estriado dorsal transcurridos 21 días desde el inicio del tratamiento (ver Figura 15, pág. 52 de la sección Materiales y métodos).

Como se muestra en la Figura 28A y B no se observaron cambios en la expresión del DAT en la membrana de fracciones sinaptosomales provenientes del NAc y estriado dorsal de animales WT y KO luego de recibir un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización conductual.

Un test de ANOVA de dos vías (genotipo y tratamiento) no mostró efecto del tratamiento (NAc $F_{(1,12)} = 0,05$, NS-Estriado dorsal $F_{(1,12)} = 0,62$, NS) o el genotipo (NAc $F_{(1,12)} = 0,52$; NS-Estriado dorsal $F_{(1,12)} = 0,09$; NS) sobre los niveles de DAT en ambas áreas cerebrales provenientes de los animales WT o KO.

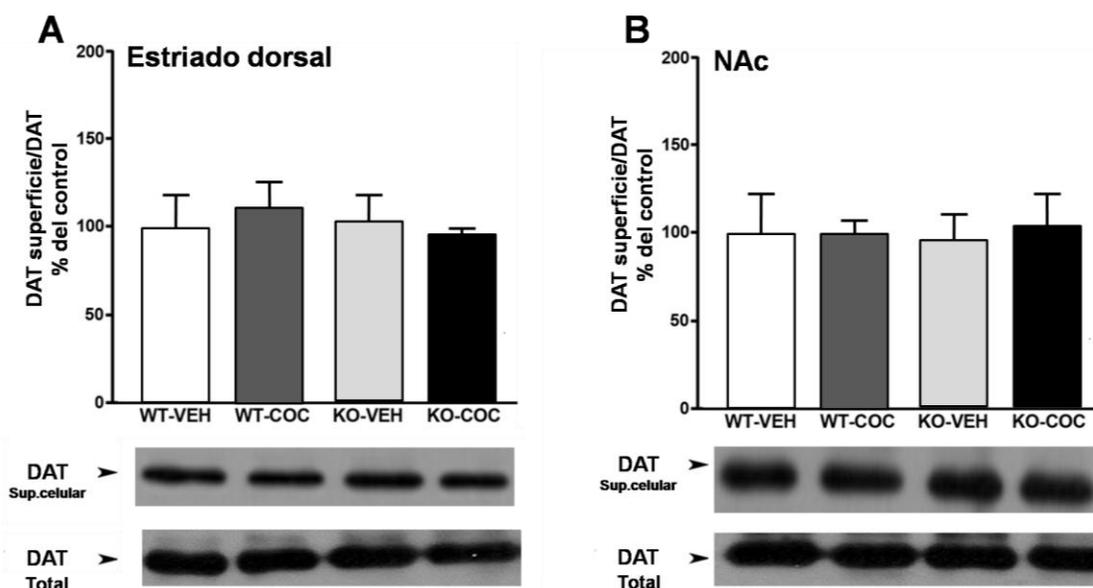


Figura 28. Niveles del transportador de dopamina (DAT) en el **A)** estriado dorsal y **B)** NAc de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína o vehículo. Los histogramas representan el nivel de DAT presente en la superficie celular normalizado a DAT total (presente en el homogenato total de cada área cerebral). Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 4 experimentos independientes. Al pie de cada gráfico se observa una imagen obtenida por inmunotransferencia de proteínas que representa los niveles de DAT determinados en cada área cerebral para los diferentes grupos experimentales.

Este resultado, conjuntamente con el observado previamente que no reveló modificaciones el efecto agudo de cocaína sobre la liberación de dopamina en el NAc de

los animales KO, sugieren que la ausencia de sensibilización a cocaína en dicho genotipo de animales no puede ser atribuida a modificaciones en el sitio de acción de la droga o ausencia de la acción primaria de la misma a nivel del NAc.

Conclusiones parciales: Estos resultados sugieren que la ausencia de encefalina no afecta el tono dopaminérgico a nivel del NAc, ni influye sobre el efecto agudo de cocaína sobre la liberación de dopamina a nivel de este centro cerebral así como tampoco interfiere con los niveles de expresión del DAT en áreas que reciben aferencias dopaminérgicas. No obstante, el sistema encefalinérgico está fuertemente involucrado en la expresión de la sensibilización a las propiedades estimulantes de cocaína sobre la liberación de dopamina a nivel del NAc.

4. Participación del sistema encefalinérgico en los eventos moleculares asociados al fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína.

Con el fin de establecer un posible rol del sistema encefalinérgico como mediador de los cambios moleculares a largo plazo asociados al fenómeno de sensibilización, se determinaron los niveles de de BDNF, pTrkB, pERK2, pERK2 nuclear, pCREB, y la expresión de receptores AMPA en superficie celular en áreas del circuito mesocórticolímbico de animales WT y KO sometidos a un esquema de tratamiento crónico con la droga (ver sección Materiales y métodos Figura 15 pág. 52).

4.1 Niveles de BDNF y pTrkB en el NAc y estriado dorsal de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización.

Como puede observarse en la Figura 29B, los animales WT tratados crónicamente con cocaína mostraron un significativo incremento en los niveles de BDNF en el NAc luego de recibir una dosis desafío con la droga 21 días después de iniciado el tratamiento, en comparación a lo observado en los animales WT tratados crónicamente con vehículo. Paralelamente a los incrementos en BDNF, se observó en el NAc de los animales WT tratados crónicamente con cocaína un aumento en los niveles de activación de TrkB, evidenciado por un incremento de la forma fosforilada del receptor (pTrkB) (Figura 30B) respecto a lo observado en los animales WT tratados crónicamente con vehículo. Contrariamente a lo observado en los animales WT, los animales KO tratados crónicamente

con vehículo o cocaína no mostraron cambios en los niveles de BDNF o pTrkB en el NAc luego de recibir una dosis desafío con la droga (Figuras 29 y 30B).

Por otra parte, no se evidenciaron cambios significativos en los niveles de BDNF en el estriado dorsal de los animales WT o KO tratados crónicamente con vehículo o cocaína (Figura 29A). Interesantemente, a pesar de que no se evidenciaron incrementos en BDNF inducidos por cocaína, se observó un aumento en los niveles de pTrkB en el estriado dorsal proveniente de los animales WT que fueron administrados crónicamente con la droga después de recibir una dosis desafío con la misma (Figuras 29 y 30A). Este efecto solo se observó en los animales WT, los animales KO que recibieron el mismo tratamiento crónico con cocaína no evidenciaron incrementos en pTrkB a nivel del estriado dorsal luego de recibir la dosis desafío con la droga (Figura 30A). Los niveles de TrkB total no se encontraron modificados en ambas áreas cerebrales provenientes de los diferentes grupos de tratamiento (Figura 30C y D).

Un test de ANOVA de dos vías mostró una interacción entre las variables estudiadas (genotipo y tratamiento) sobre los niveles de BDNF ($F_{(1,12)} = 21,14$; $p < 0,01$) y pTrkB ($F_{(1,12)} = 21,58$; $p < 0,01$) en el NAc, sin evidenciar ningún efecto sobre los niveles de TrkB ($F_{(1,12)} = 0,29$; NS). En estriado dorsal, el mismo test estadístico solo mostró un efecto del tratamiento sobre los niveles de pTrkB en esta área cerebral ($F_{(1,12)} = 3,08$; $p < 0,05$), sin evidenciar ningún tipo de efecto del genotipo o tratamiento sobre los niveles de BDNF o TrkB (BDNF $F_{(1,12)} = 0,93$; TrkB $F_{(1,12)} = 0,0021$; NS). Un análisis *post hoc* de Fisher, evidenció un incremento en los niveles de BDNF y pTrkB en el NAc de animales WT tratados crónicamente con cocaína, luego de recibir una dosis desafío con la droga en comparación a lo observado en los restantes grupos de tratamiento ($p < 0,05$).

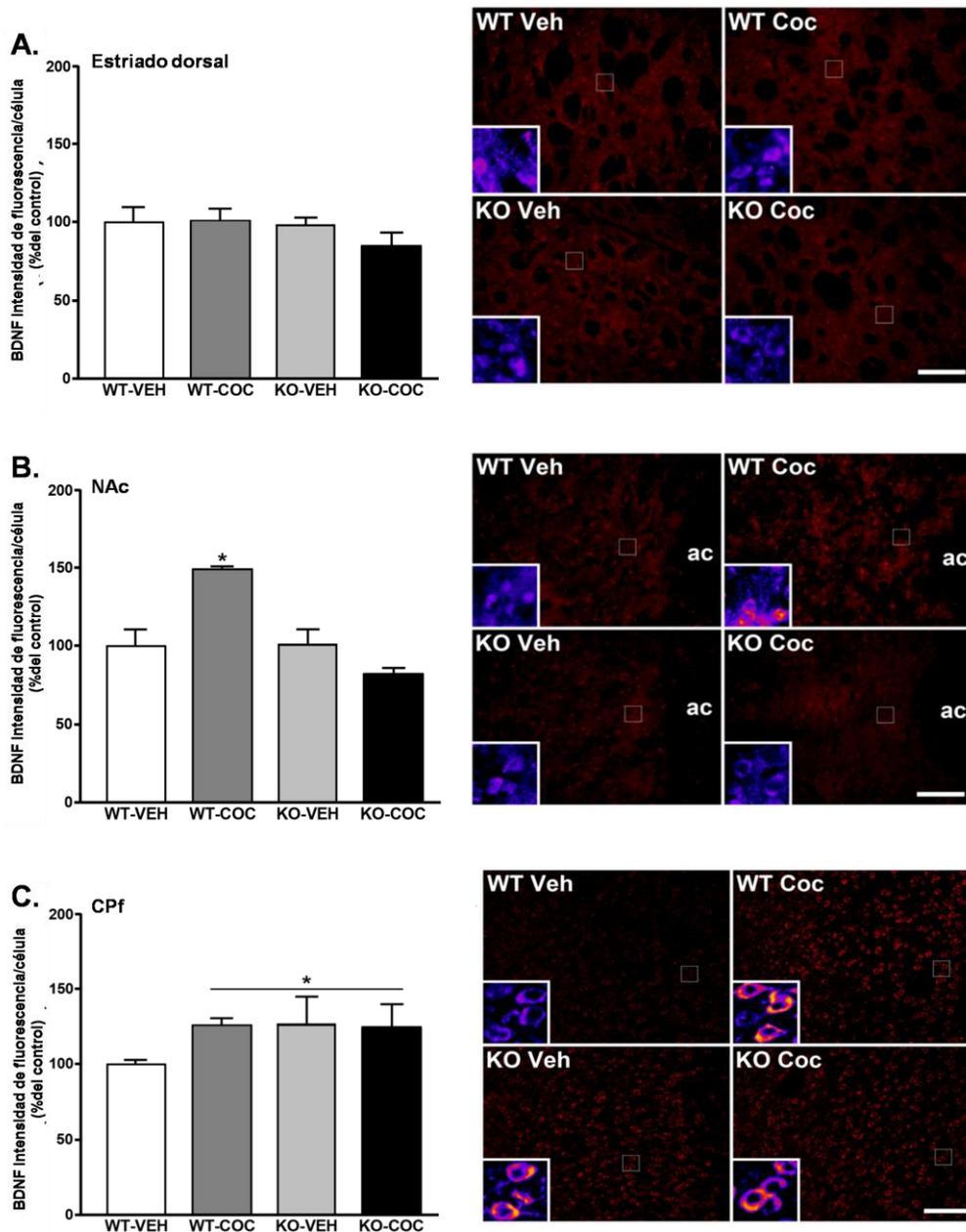


Figura 29. Niveles de BDNF en el estriado dorsal (A), NAc (B) y CPf (C) de animales WT y KO sometidos a un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización. **Panel derecho:** Microfotografías revelando la intensidad de expresión de BDNF en cada área cerebral. En el recuadro inferior cada microfotografía se muestra una magnificación digital de la microfotografía original. La imagen fue pseudo-coloreada para resaltar la intensidad de fluorescencia entre los grupos de tratamiento. Barra de escala: 100 μ m. **ac:** comisura anterior. **Panel izquierdo:** Gráficos derivados de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio por célula. Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 3 experimentos independientes * $p < 0.05$ comparado con WT-VEH y KO-VEH/COC.

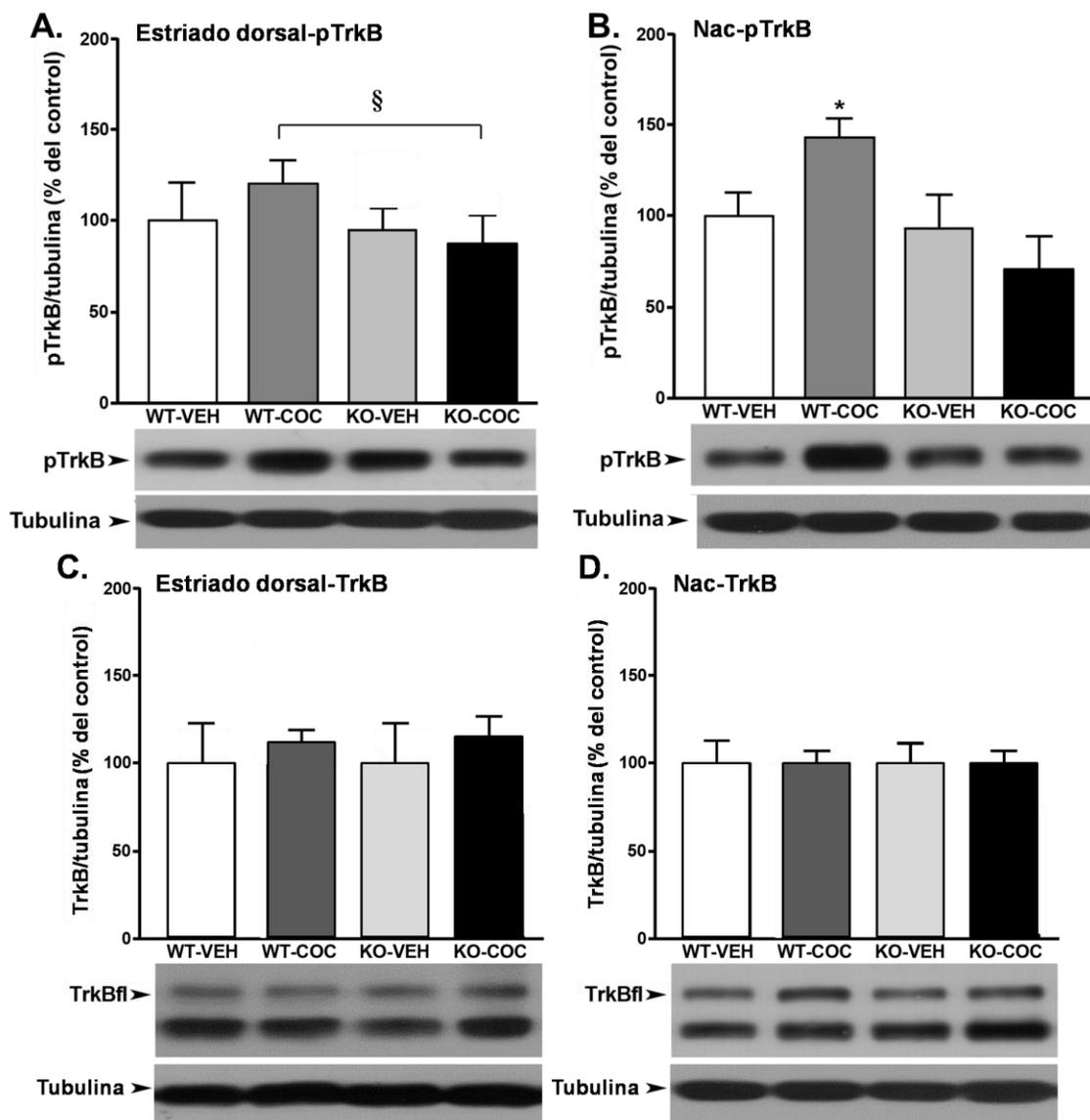


Figura 30. Niveles de pTrkB en NAc y estriado dorsal de animales WT y KO sometidos a un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización. **A)** y **B)** Niveles de pTrkB en el estriado dorsal (panel izquierdo) o el NAc (panel derecho) proveniente de ratones WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína. **C)** y **D)** Niveles de TrkB fl en el estriado dorsal (panel izquierdo) o el NAc (panel derecho) de los diferentes grupos de tratamiento. Los histogramas representan los niveles de pTrkB y TrkB normalizado a β tubulina. Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 4-5 experimentos independientes. Al pie de cada gráfico se observa una imagen obtenida por inmunotransferencia de proteínas que representa los niveles de pTrkB, TrkB y β -tubulina determinados en cada área cerebral. * $p < 0.05$ comparado con WT-VEH y KO-VEH/CO; § $p < 0.05$ comparando los grupos VEH vs. COC (tratamiento) (Fisher *post hoc* test).

4.2 Niveles de BDNF en la CPf de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización.

Si bien se ha descrito una síntesis local de BDNF en el NAc (Graham y col., 2007), la principal fuente de esta neurotrofina en dicha área cerebral proviene de aferencias glutamatérgicas de la CPf (Altar y col., 1997). Por este motivo, se estudiaron los niveles de BDNF en la CPf de animales WT y KO como fuente potencial de los cambios observados de dicha neurotrofina a nivel del NAc. Curiosamente, se evidenció un incremento en los niveles de BDNF tanto en animales WT como KO ambos tratados crónicamente con cocaína, en comparación a lo observado en los animales WT que recibieron un tratamiento crónico con vehículo (Figura 29C). Un test de ANOVA de dos vías evidenció una interacción entre las variables genotipo y el tratamiento ($F_{(1,12)}=4,34$; $p<0,05$) sobre los niveles de BDNF en la CPf. Realizando un análisis *post hoc* de Fisher se observó una diferencia significativa en los niveles de BDNF comparando el grupo de animales WT tratados crónicamente con vehículo con los demás grupos de tratamiento ($p < 0,05$).

4.3 Niveles de pERK2 en el NAc y estriado dorsal proveniente de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización.

Los eventos moleculares asociados a la sensibilización inducida por cocaína, se encuentran relacionados funcional y temporalmente entre sí: el incremento en la liberación de dopamina y en los niveles de factores tróficos (BDNF) inducidos luego de la exposición a cocaína disparan la activación de ERK2, uno de los eventos centrales asociados con la expresión de dicho fenómeno (Lu y col., 2006).

Como se puede observar en la Figura 31A y B los animales WT sometidos a un tratamiento crónico con cocaína, los cuales evidenciaron incrementos en pTrkB y/o BDNF (Figuras 29B, 30A y B), mostraron un marcado incremento en los niveles de fosforilación de ERK2 tanto en el estriado dorsal como en el NAc, luego de recibir una dosis desafío con la droga 21 días después de iniciado el tratamiento, respecto a lo observado en los animales WT tratados crónicamente con vehículo. Coincidiendo con lo observado en este experimento, numerosas evidencias demostraron que la sensibilización inducida por cocaína, además de generar alteraciones en los niveles de BDNF/pTrkB, produce un incremento en los niveles de fosforilación de ERK2 en el NAc y estriado dorsal (Mattson y

col., 2005; Marin y col., 2010). Contrariamente a lo observado en los animales WT, los animales KO que fueron administrados crónicamente con cocaína o vehículo, no mostraron incrementos significativos en los niveles de pERK2 en el estriado dorsal o el NAc luego de recibir una dosis desafío con la droga (Figura 31A y B). Un test de ANOVA de dos vías mostró un efecto del tratamiento ($F_{(1,12)} = 4,85$; $p < 0,05$) y genotipo ($F_{(1,12)} = 5,79$; $p < 0,05$) sobre los niveles de pERK2 en estriado dorsal. En el NAc, el mismo test estadístico evidenció un efecto del genotipo ($F_{(1,12)} = 13,08$; $p < 0,01$) y una interacción entre las variables estudiadas sobre los niveles de pERK2 ($F_{(1,12)} = 32,86$; $p < 0,01$). Un análisis *post hoc* de Fisher mostró una diferencia significativa en los niveles de fosforilación de ERK2 en el NAc de animales WT tratados crónicamente con cocaína tras recibir una dosis desafío con la droga, respecto a lo observado en el resto de los grupos de tratamiento.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de pERK2 en la CPf e hipocampo proveniente de los animales WT y KO tratados crónicamente con vehículo o cocaína (Figura 31C y D).

4.4 Niveles de pERK2 en el NAc, estriado dorsal y CPf de animales WT y KO administrados con una dosis aguda de cocaína.

A los fines de determinar el efecto de una dosis aguda de cocaína en ambos genotipos de animales, se midieron los niveles de pERK2 en el estriado dorsal, NAc, CPf e hipocampo en respuesta a una dosis de vehículo o cocaína 15mg/kg durante el primer día de la fase de tratamiento. La ausencia del gen de proencefalina no afectó el incremento en la fosforilación de ERK2 a nivel del estriado dorsal, Nac y CPf inducido tras una administración aguda de cocaína. Como puede en las Figuras 32A, B y C, una inyección de cocaína (15mg/kg) produjo incrementos sustanciales en los niveles de pERK2 en el NAc, estriado dorsal y CPf proveniente de animales WT y KO en comparación a lo observado en los animales de ambos genotipos que recibieron una administración de vehículo. Un test de ANOVA de dos vías (genotipo y tratamiento) mostró un marcado efecto del tratamiento sobre los niveles de pERK2 en las áreas mencionadas (Estriado dorsal $F_{(1,8)} = 5,50$; $p < 0,05$ - NAc $F_{(1,8)} = 70,56$; $p < 0,01$ - CPf $F_{(1,8)} = 24,56$; $p < 0,01$). No se observaron diferencias significativas en los niveles de pERK2 en el hipocampo de los animales WT y KO luego de una inyección aguda de cocaína o vehículo (Figura 32D).

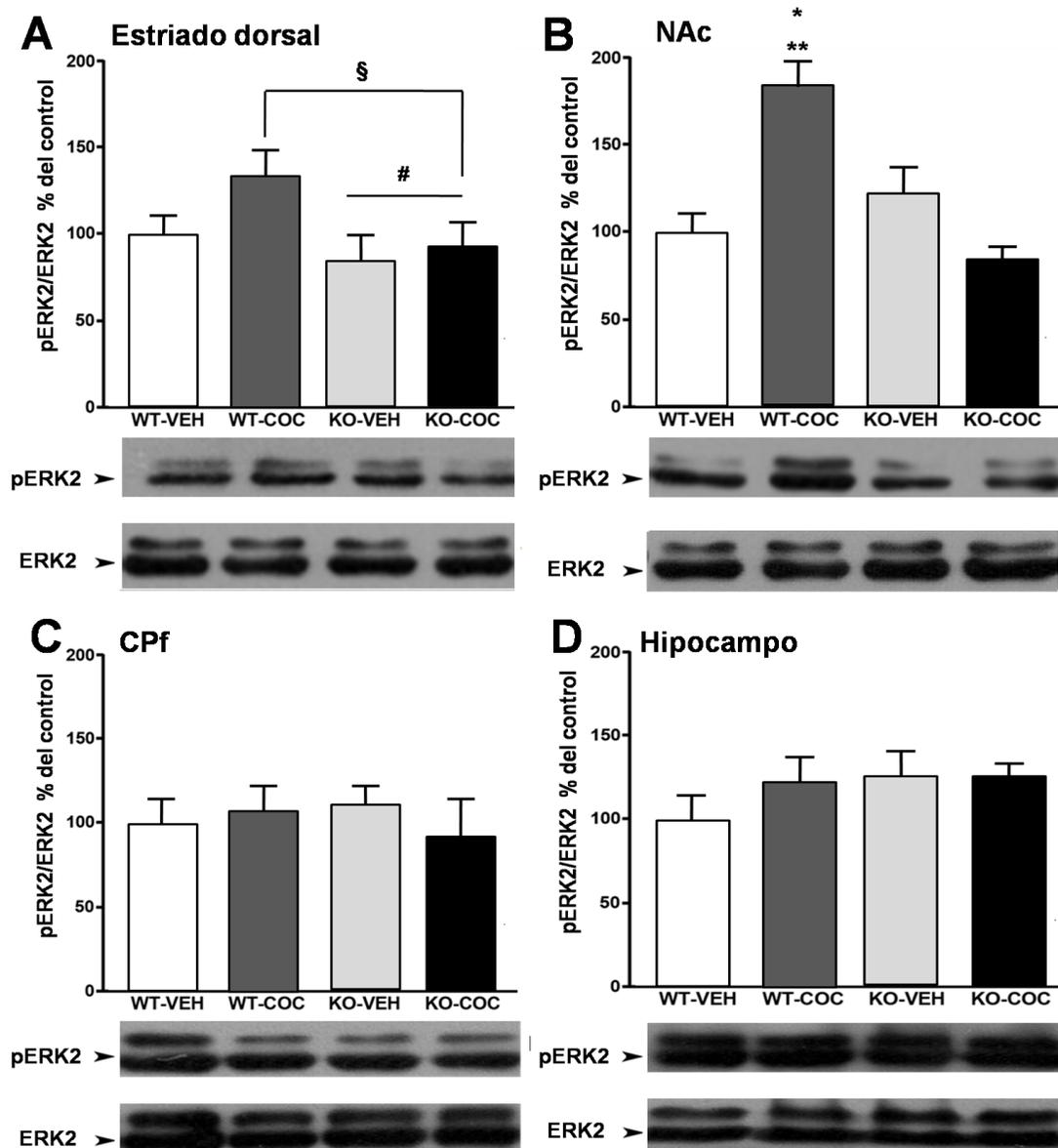


Figura 31. Niveles de fosforilación de ERK2 en el **A)** estriado dorsal, **B)** NAc, **C)** CPf e **D)** hipocampo de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización. Los histogramas representan los niveles de pERK2 normalizados a ERK2. Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 4 experimentos independientes. Al pié de cada gráfico se observa una imagen obtenida por inmunotransferencia de proteínas que representa los niveles de pERK2 y ERK2 determinados en cada área cerebral. ** $p < 0.01$ comparado con WT-VEH; * $p < 0.05$ comparado con KO-VEH/CO; § $p < 0.05$ comparando los grupos VEH vs. COC (tratamiento). # $p < 0.05$ comparando los grupos WT vs. KO (genotipo) (Fisher *post hoc* test).

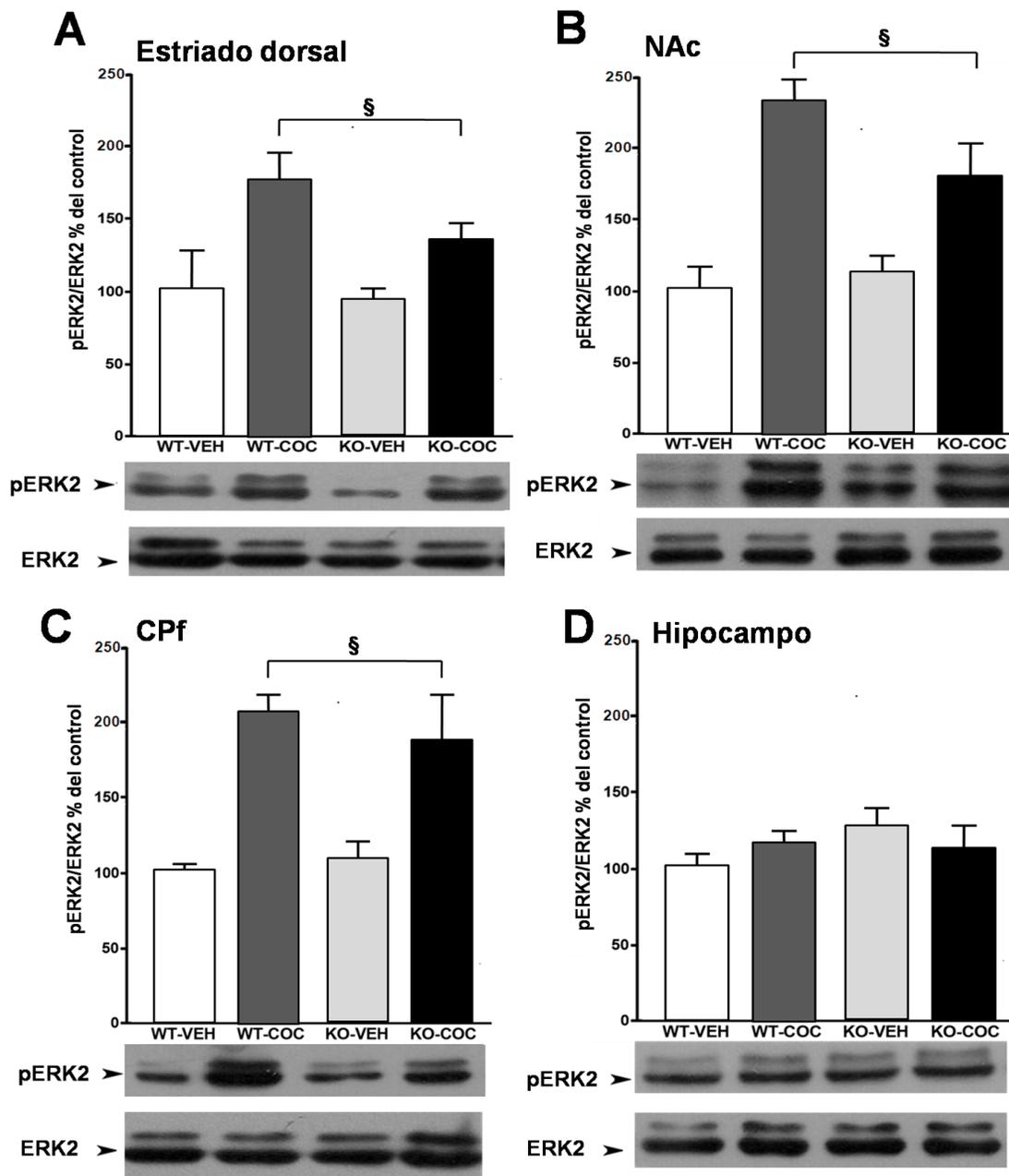


Figura 32. Niveles de pERK2 determinados a nivel del **A)** estriado dorsal, **B)** NAc, **C)** CPf e **D)** hipocampo de animales WT y KO en respuesta a una inyección aguda de cocaína (15mg/Kg). Los histogramas representan los niveles de pERK2 normalizados a ERK2. Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 3-4 experimentos independientes. Al pie de cada gráfico se observa una imagen obtenida por inmunotransferencia de proteínas que representa los niveles de pERK2 y ERK2 determinados en cada área cerebral. § $p < 0.05$ comparando los grupos VEH vs. COC (tratamiento).

4.5 Niveles de pERK2/pCREB en fracciones nucleares del NAc y estriado dorsal proveniente de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización.

Como mencionaba en la introducción del presente trabajo de tesis, luego de activarse por fosforilación ERK2 transloca al núcleo celular para activar diferentes factores de transcripción, entre los cuales se encuentra CREB (Valjent y col., 2000, 2005). Estos eventos nucleares, inician programas específicos de expresión génica necesarios para el remodelado sináptico y cambios a largo plazo en la eficiencia sináptica (Mazzucchelli y col., 2002) asociados al desarrollo y expresión del fenómeno de sensibilización. Teniendo en cuenta este antecedente, se investigó si los cambios observados en la activación de ERK2 a nivel del NAc y estriado dorsal eran lo suficientemente significativos como para afectar los niveles de pERK2/CREB nuclear en las áreas cerebrales mencionadas provenientes tanto de animales WT como KO luego de un tratamiento crónico con cocaína. Para ello, se estudiaron los niveles de fosforilación de ERK2 y CREB en fracciones nucleares del estriado dorsal y el NAc utilizando el procedimiento experimental esquematizado en la Figura 15 (ver sección Materiales y métodos, Figura 15).

Como se puede observar en la Figura 33A y B los animales WT sometidos a un tratamiento crónico con cocaína, mostraron un claro incremento en los niveles de fosforilación de ERK2 en fracciones nucleares del estriado dorsal y el NAc luego de recibir una dosis desafío con la droga, respecto a lo observado en los animales WT tratados crónicamente con vehículo. Este efecto no se observó en los animales KO administrados crónicamente ya sea con vehículo o cocaína. Un test de ANOVA de dos vías reveló una significativa interacción entre las variables genotipo y tratamiento sobre los niveles de pERK2 nucleares en ambas áreas cerebrales (Estriado dorsal $F_{(1,17)} = 4,74$; $p < 0,05$ - NAc $F_{(1,15)} = 4,73$; $p < 0,05$). Realizando un análisis *post hoc* de Fisher, se evidenció una diferencia significativa en la fosforilación de ERK2 en el NAc y estriado dorsal de animales WT tratados crónicamente con cocaína tras recibir una dosis desafío con la droga, respecto a lo observado en los restantes grupos de tratamiento ($p < 0,05$).

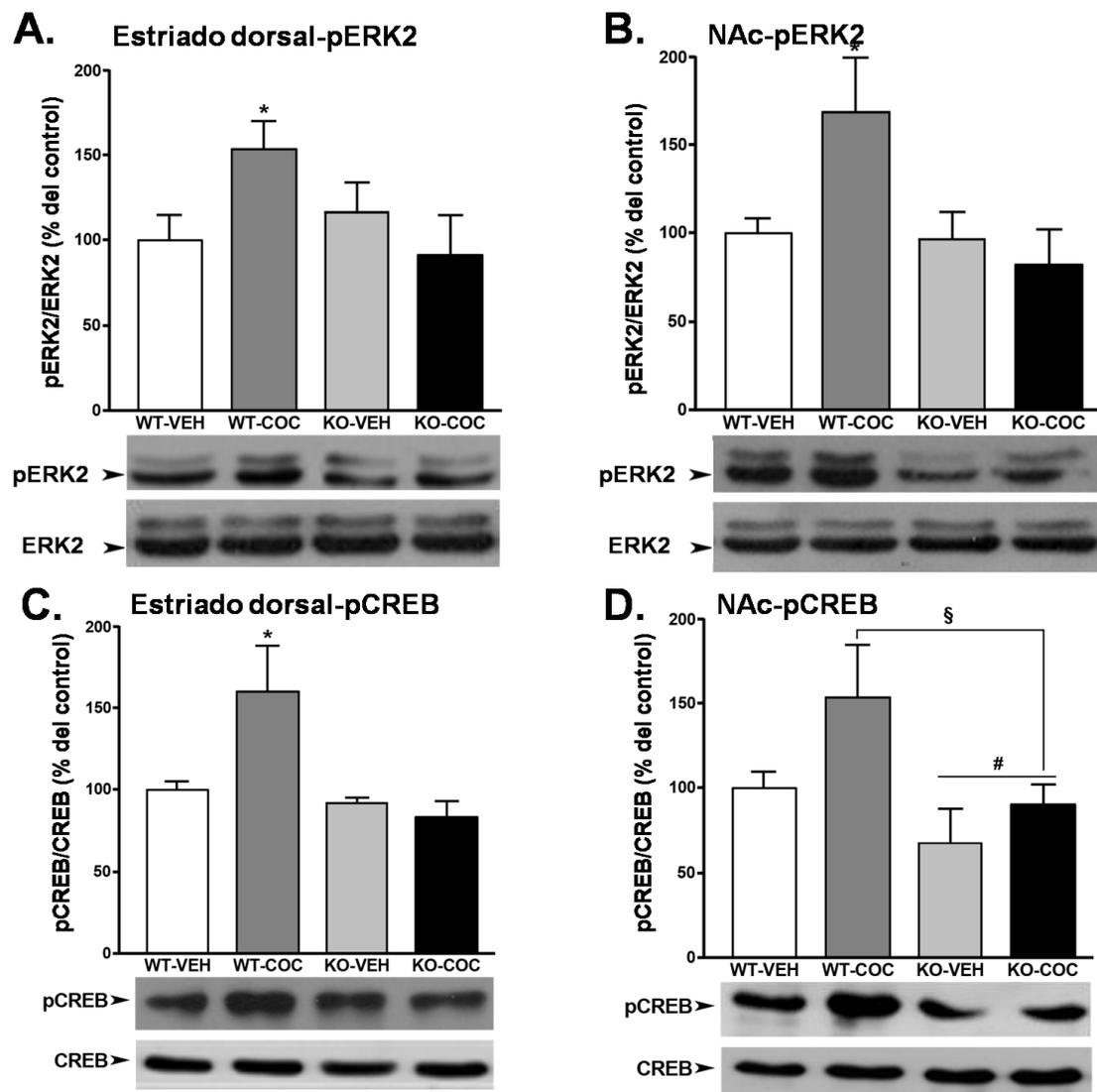


Figura 33. Niveles de fosforilación de ERK2 nuclear y CREB en estriado dorsal y NAc de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización. **A) y B)** Niveles de pERK2 en fracciones nucleares del estriado dorsal (panel izquierdo) o el NAc (panel derecho) proveniente de animales WT y KO tratados crónicamente con cocaína **C) y D)** Niveles de pCREB en fracciones nucleares del estriado dorsal y NAc proveniente de los diferentes grupos experimentales. Los histogramas representan los niveles de pERK2 y pCREB normalizados a ERK2 y CREB respectivamente. Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 5-6 experimentos independientes Al pie de cada gráfico se observa una imagen obtenida por inmunotransferencia de proteínas que representa los niveles de pERK1/2; pCREB, ERK1/2 y CREB determinados en cada área cerebral. * $p < 0,05$ comparado con WT-VEH y KO-VEH/COC; § $p < 0,05$ comparando los grupos VEH vs. COC (tratamiento). # $p < 0,05$ comparando los grupos WT vs. KO (genotipo).

La figura 33C y D, muestra los cambios en los niveles de fosforilación de CREB en los animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización. El patrón de cambio en los niveles de fosforilación de CREB fue similar al observado para pERK2 nuclear en los distintos grupos de tratamiento. Los animales WT sometidos a un tratamiento crónico con cocaína, mostraron un incremento en los niveles de fosforilación de CREB en el estriado dorsal y el NAc respecto a lo observado en los animales WT tratados crónicamente con vehículo. Este efecto no se observó en los animales KO administrados crónicamente con vehículo o cocaína. Un análisis estadístico utilizando un test de ANOVA de dos vías mostró un efecto del tratamiento ($F_{(1,17)}= 4,99$; $p<0,05$) y genotipo ($F_{(1,17)}= 6,99$; $p< 0,05$) sobre los niveles de pCREB en el NAc. En el estriado dorsal, el mismo test estadístico mostró un efecto del genotipo ($F_{(1,15)}=6,45$; $p<0,05$) y arrojó una interacción entre ambas variables ($F_{(1,15)}= 4,93$; $p<0,05$) sobre los niveles de dicha proteína. Un análisis *post hoc* de Fisher mostró una diferencia significativa en los niveles de fosforilación de CREB en los animales WT tratados crónicamente con cocaína respecto a lo observado en los restantes grupos de tratamiento ($p<0,05$).

4.6 Niveles de expresión del receptor AMPA (subunidad GluR1) en superficie celular del NAc y estriado dorsal de animales WT y KO luego de un tratamiento con cocaína que induce sensibilización.

Como fue mencionado en la introducción de esta tesis, la fosforilación de ERK2 conduce a cambios en la excitabilidad de la membrana neuronal de las células del NAc. Particularmente, la activación de ERK ha sido también implicada en el tráfico de receptores AMPA en neuronas del cuerpo estriado (Zhu y col., 2002; Huang y col., 2004; Krapivinsky y col., 2004; Zhu y col., 2005). Además, se sabe que el fenómeno de sensibilización a cocaína está asociado a incrementos en pERK2 en paralelo con un aumento en la expresión del receptor AMPA en el NAc (Boudreau y col., 2007).

Coincidiendo con lo observado por otros autores (Ferrario y col., 2010; Kim y col., 2009), los animales WT que recibieron un tratamiento crónico con cocaína mostraron un incremento en los niveles del receptor AMPA (subunidad GluR1) en la superficie celular del NAc (Figura 34B) y estriado dorsal (Figura 34A) después de ser inyectados con una

dosificación de desafío con cocaína transcurridos 21 días desde el inicio del tratamiento, en comparación a lo observado en los animales WT tratados crónicamente con vehículo. A diferencia de lo observado en los animales WT, los animales KO tratados crónicamente con vehículo o cocaína no evidenciaron incrementos en los niveles de expresión del receptor AMPA (subunidad GluR1) en la superficie celular del NAc o estriado dorsal (Figura 34A y B).

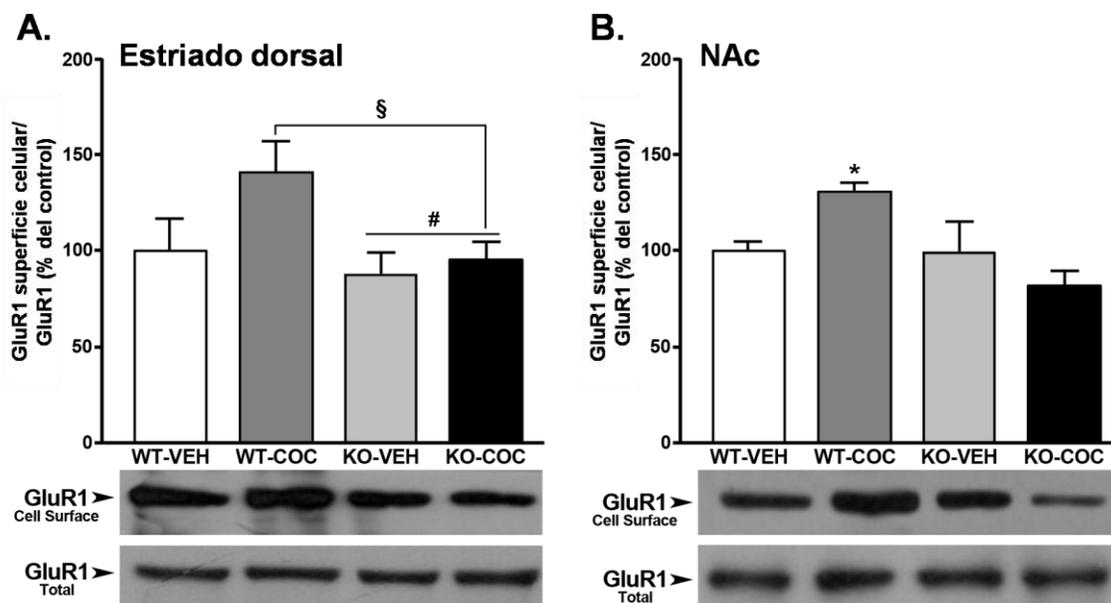


Figura 34. Niveles de expresión del receptor AMPA en la superficie celular de **A)** estriado dorsal y **B)** NAc de animales WT y KO luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización. Los histogramas representan el cociente de los niveles de GluR1 en la superficie celular/ GluR1 total (presente en el homogenato total de cada área cerebral). Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 4 experimentos independientes. Al pie de cada gráfico se observa una imagen obtenida por inmunotransferencia de proteínas que representa los niveles de GluR1 determinados en cada área cerebral. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa comparado con WT-VEH; ** $p < 0.01$, indica diferencia significativa comparado con KO-VEH/CO; § $p < 0.05$ indica diferencia significativa comparando los grupos VEH vs. COC (tratamiento). # $p < 0.05$ indica diferencia significativa comparando los grupos WT vs. KO (genotipo). (Fisher *post hoc* test).

Un test de ANOVA de dos vías (genotipo y tratamiento), mostró un efecto del tratamiento ($F_{(1,12)} = 6,65$; $p < 0.05$) y el genotipo ($F_{(1,12)} = 8,73$; $p < 0,05$) sobre los niveles de expresión del receptor AMPA (subunidad GluR1) en la superficie celular del estriado dorsal. Utilizando el mismo test estadístico, se encontró un efecto del genotipo ($F_{(1,12)} =$

7,57; $p < 0,05$) y una interacción entre las variables estudiadas sobre los niveles de expresión del receptor en la superficie celular del NAc ($F_{(1,12)} = 6,88$; $p < 0,05$). Un análisis *post hoc* de Fischer reveló una diferencia significativa en los niveles de expresión del receptor AMPA (subunidad GluR1) en el NAc en los animales WT tratados crónicamente con cocaína que recibieron una dosis desafío con la droga, con respecto a lo observado en animales WT tratados crónicamente con vehículo ($p < 0,05$) y los animales KO tratados crónicamente con vehículo o cocaína ($p < 0,01$) que recibieron la misma dosis desafío con la droga.

Como fue descrito previamente (Shumman y Yaka, 2009; Boudreau y col., 2007), el incremento en la expresión del receptor AMPA en los animales WT expuestos crónicamente a cocaína, se correlaciona funcional y temporalmente con el incremento en los niveles de fosforilación de ERK2 evidenciado en dichos animales, sugiriendo una relación causal en la activación de ambos eventos a nivel de NAc y estriado dorsal.

Conclusiones parciales: El sistema encefalinérgico es necesario para generar los cambios moleculares a largo término a nivel del NAc y estriado dorsal que sustentan la sensibilización conductual inducida por cocaína

5. Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el fenómeno de sensibilización a cocaína y eventos moleculares asociados.

Teniendo en cuenta que encefalina se une con alta afinidad a receptores μ - y δ -opioides (Mansour y col., 1995b) y considerando las evidencias que indican que NX (un antagonista opiáceo no selectivo) suprime la sensibilización a cocaína (Kim y col., 1997) y resulta efectivo como farmacoterapia para la adicción a la droga (Comer y col., 2013; Mooney y col., 2013; Schmitz y col., 2009), se estudió si NX podría revertir la plasticidad conductual y neuronal inducida por cocaína en los ratones WT, de una manera similar a la observada en los ratones KO y, a su vez, establecer las bases neurobiológicas que aporten a la comprensión de las evidencias conductuales y observaciones clínicas mencionadas.

Con este fin, se evaluó la expresión de la sensibilización conductual inducida por cocaína y se determinaron los niveles de pERK2, pCREB, expresión de receptores AMPA en superficie celular, niveles de BDNF y pTrkB en NAc, estriado dorsal, CPf y ATV de animales pre-tratados con vehículo o NX y sometidos a un esquema de tratamiento crónico

con cocaína que induce sensibilización (ver Figura 16, pág. 53 de la sección Materiales y Métodos).

5.1 Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el desarrollo del fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína.

Reproduciendo los resultados conductuales observados previamente en los animales WT (Figura 25A), los animales que recibieron un pre-tratamiento con vehículo antes de cada administración de cocaína (15mg/kg) manifestaron la expresión de la sensibilización conductual inducida por la droga tras la administración de una dosis desafío con la misma al día 15 de iniciado el tratamiento (Figura 35A). Este efecto fue evidenciado por un marcado incremento en la actividad locomotora de dichos animales después de recibir la dosis desafío con cocaína (7,5 mg/kg), en comparación a la respuesta conductual observada en los animales tratados crónicamente con vehículo luego de recibir la misma dosis desafío. A diferencia de esto, los animales que fueron pre-tratados con NX (1 mg/kg s.c.) 15 min antes de cada inyección de cocaína durante la fase de tratamiento, no expresaron el fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína luego de recibir una dosis desafío con la droga (Figura 35A). No se observaron diferencias significativas en la actividad locomotora de los animales pre-tratados con NX y tratados crónicamente con cocaína o vehículo luego de ser administrados con una dosis desafío con cocaína al día 15 de iniciado el tratamiento (Figura 35A) (tratamiento $F_{(1,22)}=6,00$; $p < 0,05$ -interacción $F_{(1,22)}=5,19$; $p < 0,05$). Un análisis *post hoc* de Bonferroni reveló un aumento en la actividad locomotora de los animales cuando la dosis desafío con cocaína se administró en el día 15 a los animales pre-tratados con vehículo y tratados crónicamente con cocaína, en comparación a la respuesta conductual observada en los animales que recibieron el mismo pre-tratamiento y fueron tratados crónicamente con vehículo ($p < 0,01$). El mismo análisis *post hoc* reveló que los animales que recibieron un pre-tratamiento con NX no mostraron diferencias significativas en la actividad locomotora frente al desafío con cocaína ($p < 0,05$) respecto a lo observado en los animales pre-tratados con vehículo o NX y tratados crónicamente con la droga.

Se observaron resultados similares tras la administración de una dosis desafío con cocaína en el día 21 de iniciado el tratamiento (Figura 35B). En los animales que recibieron

como pre-tratamiento vehículo previo a cada administración de cocaína (15mg/kg) se observó la expresión de la sensibilización conductual inducida por la droga tras la administración de una dosis desafío con la misma. A diferencia de esto, los animales que fueron pre-tratados con NX (1 mg/kg s.c.) 15min antes de cada inyección de cocaína durante la fase de tratamiento, no expresaron el fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína (tratamiento $F_{(1, 22)} = 12,18$; $p < 0,05$ -interacción $F_{(1,22)} = 5, 17$ $p < 0,05$) sobre la actividad locomotora de los animales al día 21 de iniciado el tratamiento. Un análisis *post hoc* de Bonferroni, reveló una diferencia significativa en la actividad locomotora de los animales pre-tratados con vehículo y tratados crónicamente con cocaína tras recibir una dosis desafío con la droga en comparación a la respuesta conductual observada en los animales pre-tratados con NX y tratados crónicamente con vehículo o cocaína luego de recibir la misma dosis desafío ($p < 0,05$) (Figura 35B).

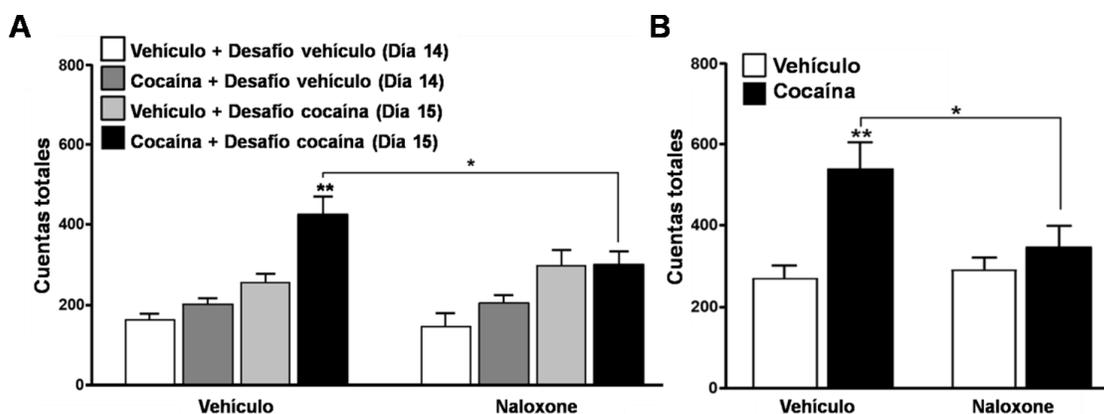


Figura 35. Actividad locomotora en respuesta a una dosis desafío de vehículo en el día 14, una dosis desafío con cocaína 7,5mg/Kg en el día 15 C) y 21 en animales tratados previamente con vehículo o cocaína (9 días-15mg/kg) y pre-tratados con vehículo o NX (1mg/kg). Los datos están representados como el promedio de cuentas totales/ 30min \pm EEM (VEH-VEH n= 6; VEH-COC n=7; NX-VEH n=7; NX-COC=6 animales/grupo) ** $p < 0,01$ comparando con VE-VE; * $p < 0,05$ comparado con VEH-VEH o NX-VEH/COC.

La administración de NX previo a cocaína, no afectó la respuesta estimulante motora luego de una administración aguda de la droga (Figura 36). Ambos grupos de pre-tratamiento (vehículo o NX) mostraron un marcado incremento en la actividad locomotora frente a una dosis aguda de cocaína (15mg/kg), en comparación a la respuesta observada en los animales de los mismos grupos de pre-tratamiento que recibieron una administración de vehículo. Un test de ANOVA de dos vías, mostró un significativo efecto del tratamiento

sobre la actividad locomotora de los animales ($F_{(1,22)}= 36,40$; $p<0,01$), sin mostrar ningún efecto del pre-tratamiento o interacción entre ambas variables en respuesta a la droga.

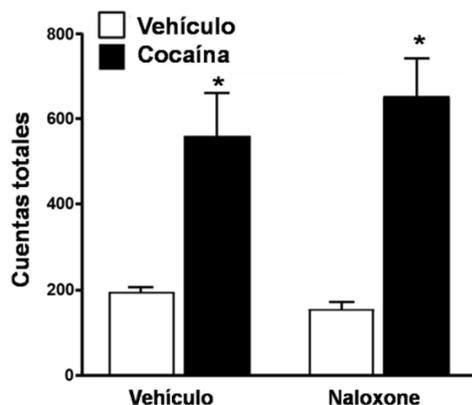


Figura 36. Actividad locomotora en respuesta a una dosis aguda de cocaína (15mg/kg) en animales pre-tratados con vehículo o NX (1mg/kg). Los datos están representados como el promedio de cuentas totales/30min \pm EEM (VEH-VEH n= 6; VEH-COC n=7; NX-VEH n=7; NX-COC=6 animales/grupo) * $p<0.05$ comparado con VEH-VEH o NX-VEH.

5.2 Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el desarrollo de los eventos moleculares asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína.

-Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el incremento en los niveles de BDNF/pTrkB a nivel de NAc asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína.

En coincidencia con lo observado previamente en los animales WT (Figura 29B), un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización conductual produjo un aumento en los niveles de BDNF y de la forma fosforilada del receptor TrkB en el NAc, 21 días después de iniciado el tratamiento o con la droga. (Grupo VEH-COC Figura 37 y 38B). Un pre-tratamiento con NX previo a cada administración de cocaína durante la fase de tratamiento, previno los incrementos en BDNF (Figura 37B) y pTrkB (Figura 38B) inducidos por la cocaína a nivel del área cerebral mencionada.

Por otra parte, en el estriado dorsal no se observó ningún cambio respecto a los niveles de BDNF (Figura 37A) en los diferentes grupos experimentales. Sin embargo, los animales pre-tratados con vehículo y tratados crónicamente con cocaína mostraron incrementos en los niveles de pTrkB en dicha área cerebral tras recibir una dosis desafío

con la droga (Figura 38A). Un pre-tratamiento con NX previo a cada administración de cocaína durante la fase de tratamiento previno dicho aumento. Interessantemente, se repitió el resultado observado anteriormente en los ratones WT tratados crónicamente con cocaína (Figura 30A), donde se evidenció un incremento en los niveles de pTrkB a nivel del estriado dorsal sin observarse cambios en los niveles de su agonista (BDNF).

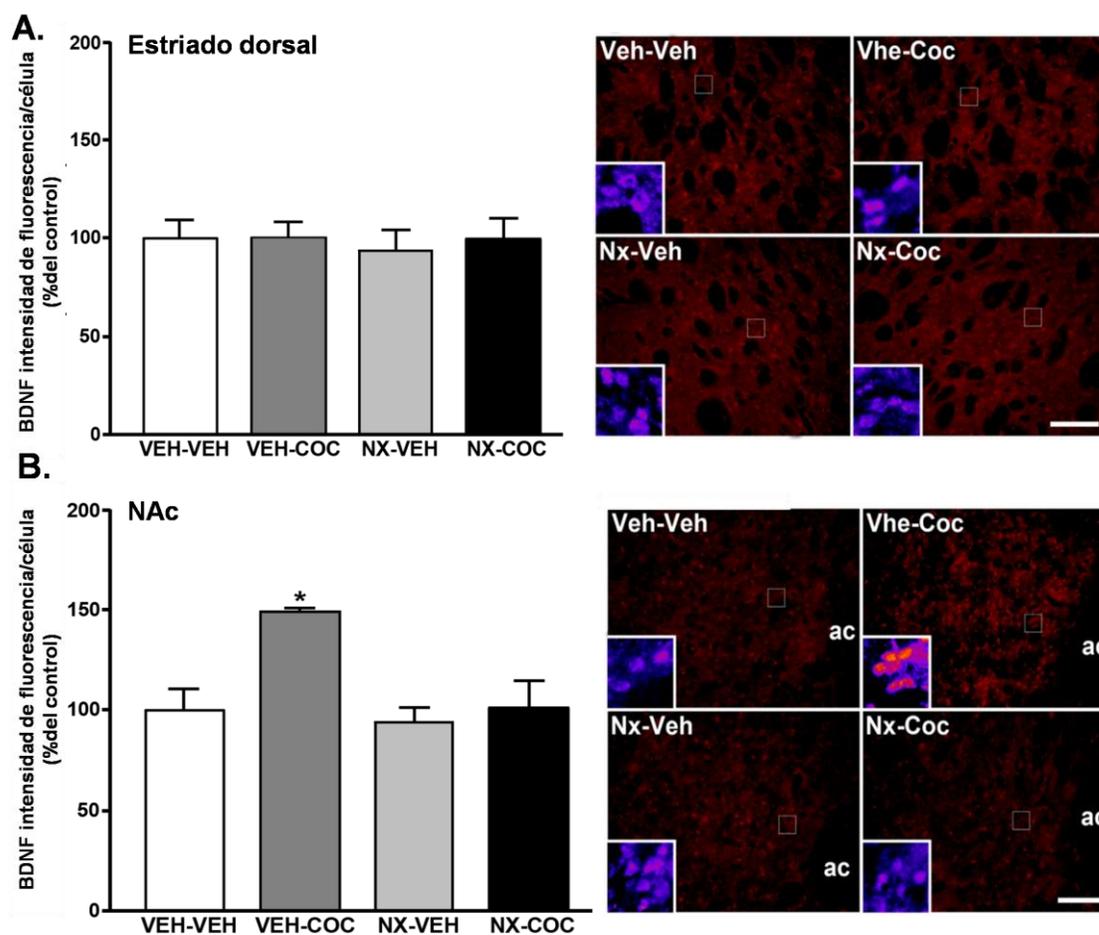


Figura 37. Niveles de BDNF en el A) estriado dorsal y B) NAc de animales pre-tratados con NX previo a cada administración de cocaína durante la fase de tratamiento. **Panel derecho:** Microfotografías mostrando la tinción inmunofluorescente que revela la localización e intensidad de expresión de BDNF en estriado dorsal y NAc respectivamente. En el recuadro inferior de cada microfotografía se muestra una magnificación digital de la microfotografía original. La imagen fue pseudo-coloreada para resaltar la intensidad de fluorescencia entre los grupos de tratamiento. Barra de escala: 100 μ m. **ac:** comisura anterior **Panel izquierdo:** Gráficos derivado de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio por célula. Los histogramas representan los niveles normalizados de BDNF en estriado dorsal y NAc. Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 3-4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ comparado con VEH-VEH y NX-VEH/CO.

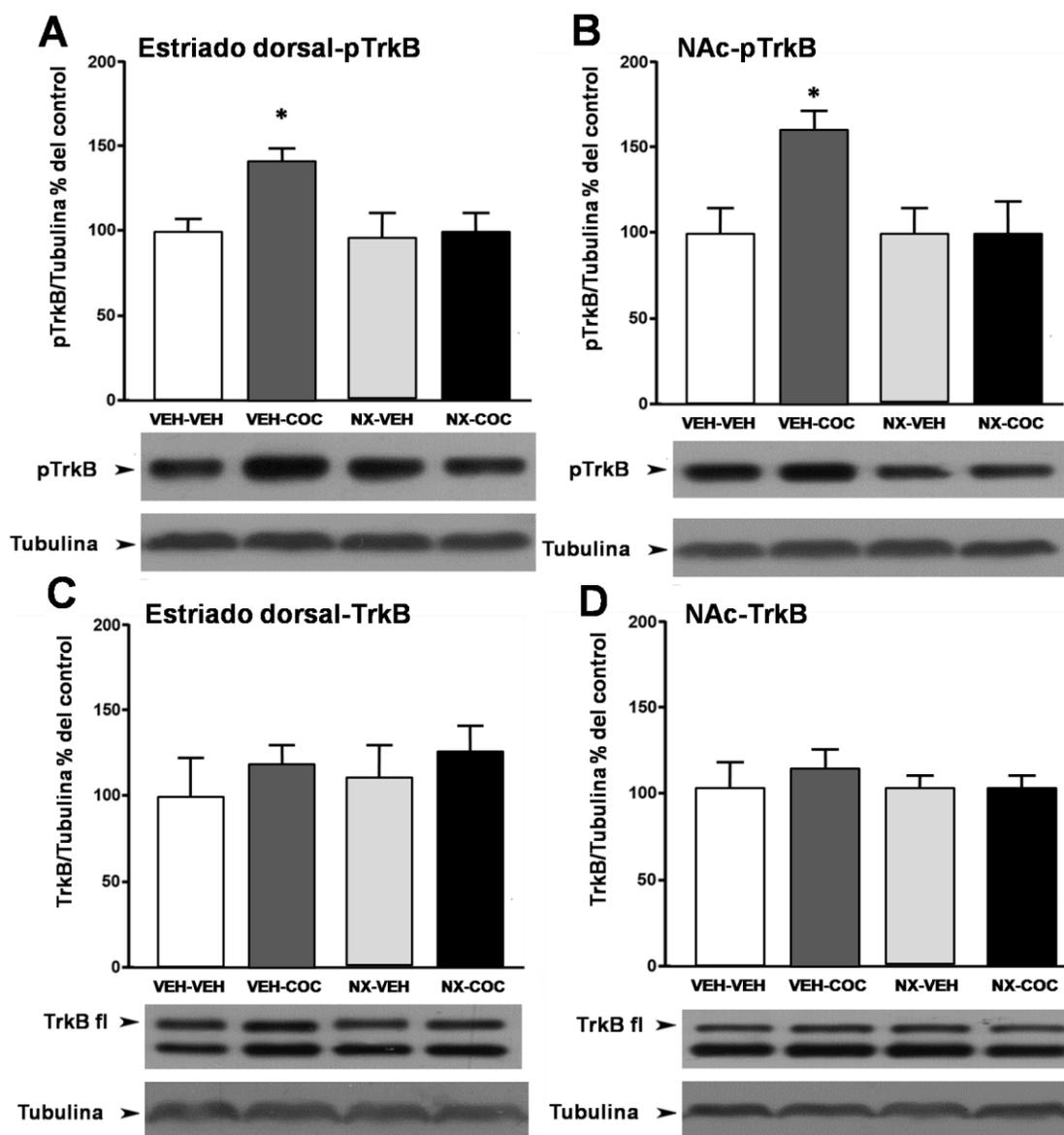


Figura 38. Niveles de pTrkB en NAc y estriado dorsal de animales pre-tratados con NX previo a cada administración de cocaína. **A)** Niveles de pTrkB en el estriado dorsal (panel izquierdo) o NAc (panel derecho) luego de un tratamiento crónico con cocaína. **B)** Niveles de TrkB fl en el estriado dorsal (panel izquierdo) o el NAc (panel derecho) de los diferentes grupos de tratamiento. Los histogramas representan los niveles de pTrkB y TrkB fl normalizado a β tubulina. Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 5-6 experimentos independientes. Al pie de cada gráfico se observa una imagen obtenida por inmunotransferencia de proteínas que representa los niveles de pTrkB, TrkBfl, TrkB T y β tubulina determinados en cada área cerebral. * $p < 0,05$ comparado con VEH-VEH y NX-VEH/COC.

No se registraron cambios en los niveles de TrkB total a nivel del NAc y estriado dorsal de los animales de los diferentes grupos experimentales (Figura 38C y D).

Un test de ANOVA de dos vías evidenció una interacción entre el tratamiento y pre-tratamiento sobre los niveles de BDNF y pTrkB a nivel del NAc (BDNF $F_{(1,12)}=5,32$; $p<0,05$, pTrkB $F_{(1,12)}=6,26$; $p<0,05$), sin mostrar ningún efecto de estas variables sobre los niveles de TrkB total ($F_{(1,12)}=0,58$; NS). En el estriado dorsal, el mismo test estadístico, reveló una interacción entre el pre-tratamiento y el tratamiento solo sobre los niveles de pTrkB ($F_{(1,12)}=4,96$; $p<0,05$), sin mostrar ningún efecto sobre los niveles de BDNF ($F_{(1,12)}=0,06$; NS). Comparaciones *post hoc* (Fisher) revelaron una diferencia significativa en los niveles de BDNF y pTrkB en el NAc de animales pre-tratados con vehículo y tratados crónicamente con cocaína luego de recibir una dosis desafío con la droga, respecto a lo observado en el resto de los grupos de tratamiento ($p<0,05$). En el estriado dorsal, el mismo análisis *post hoc* mostró una diferencia significativa en los niveles de pTrkB comparando los grupos de tratamiento mencionados anteriormente ($p<0,05$).

-Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el incremento en los niveles de BDNF a nivel del ATV y CPf asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína.

Teniendo en cuenta el resultado previo donde se evidenció un aumento en los niveles de BDNF inducidos por cocaína en la CPf de animales WT y KO sometidos a un tratamiento crónico con la droga (Figura 29C), se estudiaron los niveles de BDNF en la CPf de los animales pre-tratados con vehículo y NX y administrados crónicamente con cocaína o vehículo. En los mismos grupos experimentales se estudiaron los niveles de BDNF en el ATV ya que corresponde a una segunda fuente de la neurotrofina hacia NAc (Segoogy y col., 1994). Curiosamente, los datos obtenidos sobre los niveles de BDNF en la CPf de animales pre-tratados con NX, fueron similares a los resultados observados en la CPf de los ratones KO (Figura 29A y 39A). Se encontró un incremento en los niveles del factor trófico en el área cerebral mencionada proveniente de animales pre-tratados con vehículo y NX, ambos tratados crónicamente con cocaína, en comparación a lo observado en los animales control (Figura 39A). Un test de ANOVA de dos vías evidenció una interacción entre las variables pre-tratamiento y tratamiento respecto de los niveles de BDNF a nivel de la CPf ($F_{(1,12)}= 9,34$, $p <0,05$). Comparaciones *post hoc* de Fisher revelaron una diferencia

significativa en los niveles de BDNF comparando el grupo control con los restantes grupos de tratamiento ($p < 0,05$).

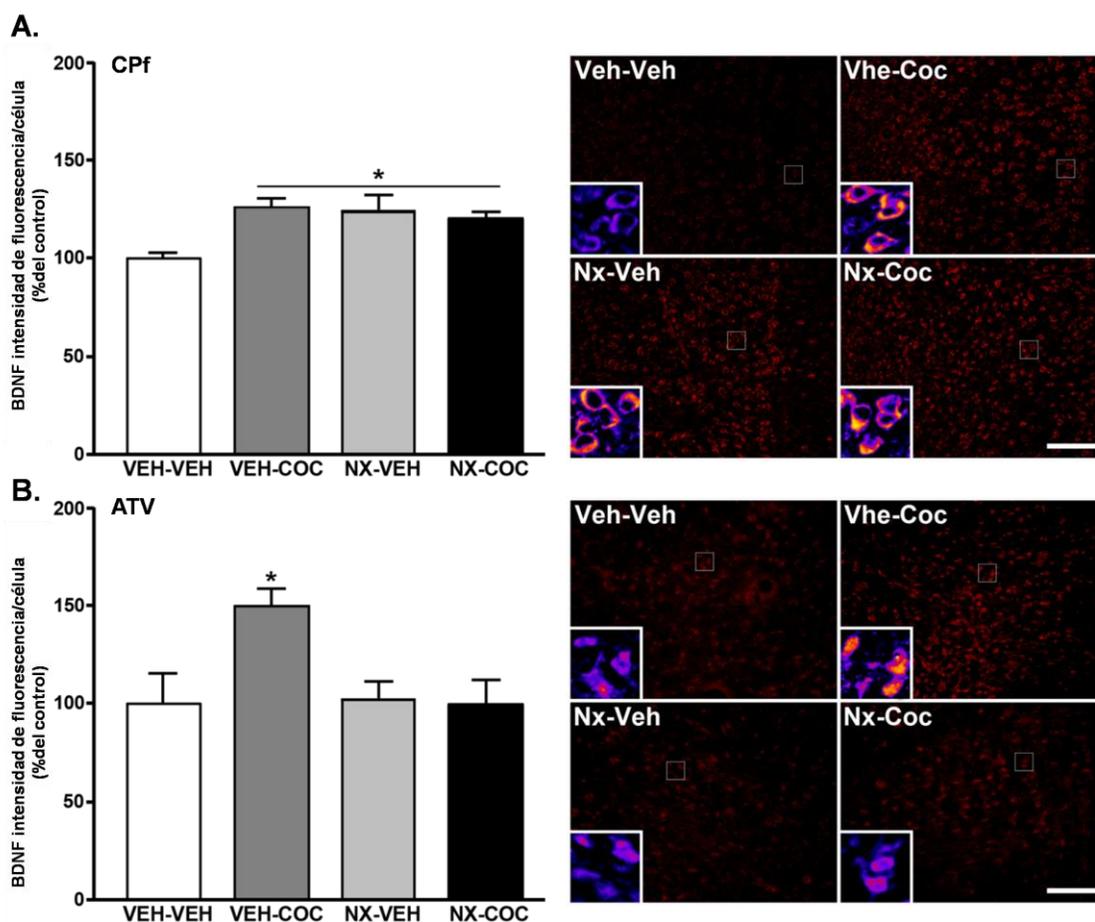


Figura 39. Niveles de BDNF en la CPF (A) y ATV (B) de animales pre-tratados con NX previo a cada administración de cocaína. **Panel derecho:** Microfotografías mostrando la tinción inmunofluorescente que revela la localización e intensidad de expresión de BDNF en CPF y ATV respectivamente. En el recuadro inferior de cada microfotografía se muestra una magnificación digital de la microfotografía original. La imagen fue pseudo-coloreada para resaltar la intensidad de fluorescencia entre los grupos de tratamiento. Barra de escala: 100 µm. **Panel izquierdo:** Gráfico derivado de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio por célula. Los histogramas representan los niveles normalizados de BDNF en CPF y ATV. Los datos están representados como la media ± EEM normalizados al grupo control y corresponden a 3-4 experimentos independientes* $p < 0,05$ comparado con VEH-VEH y NX-VEH/COC.

En el ATV se observaron resultados similares a los observados en el NAc: se evidenció un incremento en los niveles de BDNF en los animales pre-tratados con vehículo y tratados crónicamente con cocaína luego de recibir una dosis desafío con la droga (Figura

39B) respecto a lo observado en los animales que recibieron el mismo pre-tratamiento pero fueron tratados crónicamente con vehículo. Un pre-tratamiento con NX previo a cada administración de cocaína durante la fase de tratamiento, previno el incremento en los niveles de BDNF inducidos por cocaína en esta área cerebral. Un test de ANOVA de dos vías mostró una interacción entre las variables pre-tratamiento y tratamiento, respecto a los niveles de BDNF en esta área cerebral ($F_{(1,12)}=5,04$; $p<0,05$). Un análisis *post hoc* mostró una diferencia significativa en los niveles de BDNF en animales pre-tratados con vehículo y tratados crónicamente con cocaína, respecto a lo observado en los restantes grupos de tratamiento ($p<0,05$).

-Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el incremento en los niveles de pERK2 y pCREB a nivel del NAc y estriado dorsal asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína.

Como se observa en la figura 40A y B un pre-tratamiento con NX previno los incrementos en la fosforilación de ERK2 inducidos por un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización conductual. Un test de ANOVA de dos vías (pre-tratamiento y tratamiento) mostró un efecto del pre-tratamiento sobre los niveles de pERK2 en el NAc ($F_{(1,16)}=7,52$; $p<0,05$) y estriado dorsal ($F_{(1,17)}=5,73$; $p<0,05$).

La Figura 40C y D muestra las modificaciones en los niveles de pCREB en animales que recibieron un pre-tratamiento con NX previo a cada administración de cocaína durante la fase de tratamiento. En el NAc, se observó que el pre-tratamiento con NX previno los incrementos en pCREB inducidos por un tratamiento crónico con cocaína (Figura 45D). Un test de ANOVA de dos vías mostró una interacción entre las variables estudiadas (pre-tratamiento y tratamiento), sobre los niveles de pCREB en esta área cerebral ($F_{(1,16)}=4,97$; $p<0,05$). Comparaciones *post hoc* evidenciaron una diferencia significativa en los niveles de pCREB en el NAc de animales pre-tratados con vehículo y tratados crónicamente con cocaína luego de recibir una dosis desafío con la droga, respecto a lo observado en animales pre-tratados con NX y que recibieron una administración crónica de cocaína tras recibir la misma dosis desafío.

A nivel del estriado dorsal se observa un resultado diferente: se evidenció un incremento en los niveles de pCREB en los animales pre-tratados con vehículo y tratados

crónicamente con cocaína, pero el pre-tratamiento con NX previo a cocaína no fue capaz de prevenir dicho aumento (Figura 40C). Un test de ANOVA de dos vías (pre-tratamiento y tratamiento) mostró un efecto del tratamiento sobre los niveles de pCREB en el estriado dorsal ($F_{(1,17)} = 6,687$; $p < 0,05$), sin evidenciar ningún efecto del pre-tratamiento o interacción entre las variables estudiadas sobre los niveles de dicha proteína.

-Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el incremento en la expresión de receptores AMPA (subunidad GluR1) en la superficie celular del NAc y estriado dorsal asociados al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína.

La Figura 41A y B muestra las modificaciones en los niveles de expresión del receptor AMPA (subunidad GluR1) en animales que recibieron un pre-tratamiento con NX previo a cada administración de cocaína durante la fase de tratamiento. En el NAc se observó que el pre-tratamiento con NX previno los incrementos en la expresión del receptor AMPA (subunidad GluR1) inducidos por cocaína (Figura 41B). Un test de ANOVA de dos vías mostró una interacción entre las variables estudiadas (pre-tratamiento y tratamiento), sobre los niveles de AMPA (subunidad GluR1) en esta área cerebral ($F_{(1,12)} = 4,851$; $p < 0,05$). Comparaciones *post hoc* evidenciaron una diferencia significativa en los niveles del receptor en el NAc de animales pre-tratados con vehículo y tratados crónicamente con cocaína luego de recibir una dosis desafío con la droga, respecto a lo observado en animales que recibieron el mismo tratamiento pero fueron pre-tratados con NX. De manera similar a lo observado con respecto a los niveles de pCREB en el estriado dorsal de animales pre-tratados con NX (Figura 40C), el incremento en los niveles de expresión del receptor AMPA (subunidad GluR1) inducidos por cocaína en esta área cerebral (Figura 41A) no pudo prevenirse utilizando un pre-tratamiento con NX. Se evidenció un incremento en la expresión del receptor en el estriado dorsal proveniente de animales pre-tratados con vehículo y tratados crónicamente con cocaína, pero un pre-tratamiento con NX previo a cocaína no fue capaz de revertir este efecto. Un test de ANOVA de dos vías (pre-tratamiento y tratamiento) mostró un efecto del tratamiento sobre los niveles de expresión del receptor AMPA en el estriado dorsal ($F_{(1,16)} = 6,687$; $p < 0,05$), sin evidenciar ningún efecto del pre-tratamiento o interacción entre las variables estudiadas sobre los niveles de dicho receptor en esta área cerebral.

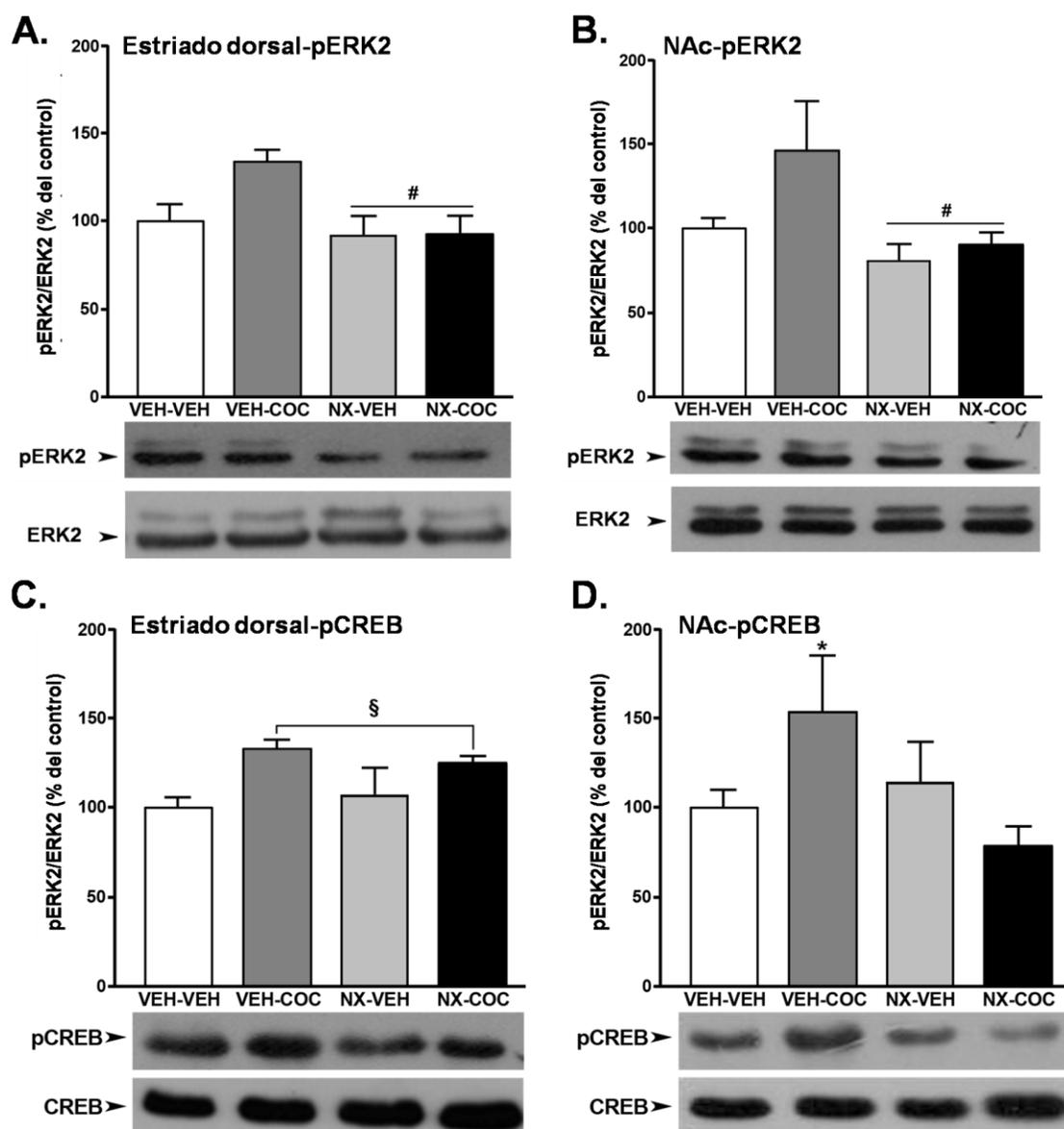


Figura 40. Niveles de fosforilación de ERK2 y CREB en estriado dorsal y NAc de animales pre-tratados con NX previo a cada administración de cocaína durante la fase de tratamiento. **A)** Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el incremento en los niveles de pERK2 inducidos por cocaína en estriado dorsal y **B)** NAc. **C)** Efecto de un pre-tratamiento con NX sobre el incremento en los niveles de pCREB inducidos por cocaína en el estriado dorsal y **D)** NAc. Los histogramas representan los niveles de pERK2 y pCREB normalizados a ERK2 y CREB respectivamente. Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 5-6 experimentos independientes. Al pie de cada gráfico se observa una imagen obtenida por inmunotransferencia de proteínas que representa los niveles de pERK1/2; pCREB, ERK1/2 y CREB determinados en cada área cerebral. * $p < 0.05$ comparado con NX-CO; § $p < 0.05$ comparando los grupos VEH vs. COC (tratamiento). # $p < 0.05$ comparando los grupos VEH vs. NX (pre-tratamiento).

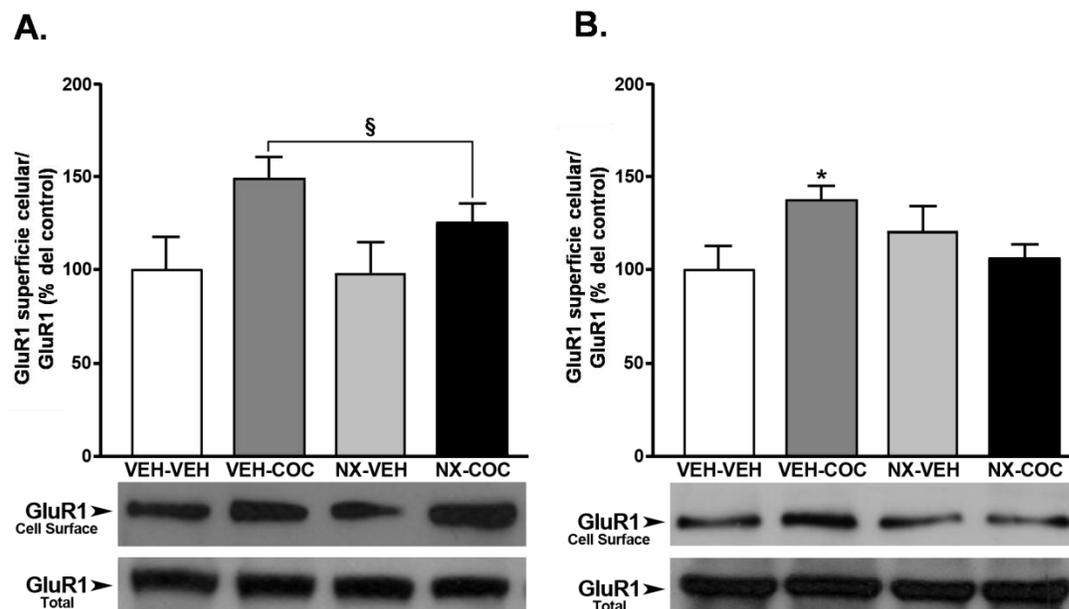


Figura 41. Niveles de expresión del receptor AMPA en el **A)** estriado dorsal y **B)** NAc de animales pre-tratados con NX previo a cocaína. Los histogramas representan el cociente de los niveles de GluR1 en la superficie celular/ GluR1 total (presente en el homogenato total de cada área cerebral. Los datos están representados como la media \pm EEM normalizados al grupo control y corresponden a 4 experimentos independientes. Al pie de cada gráfico se observa una imagen obtenida por inmunotransferencia de proteínas que representa los niveles de GluR1 determinados en cada área cerebral. * $p < 0.05$ comparado con NX-CO; § $p < 0.05$ comparando los grupos VEH vs. COC (tratamiento).

Conclusiones parciales: Los receptores opioides están involucrados en el desarrollo del fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína y los cambios moleculares a largo plazo a nivel del NAc asociados al fenómeno. Además, estos resultados sugieren que encefalina a través de su actividad agonística sobre los receptores μ - y δ - opioides media su efecto permisivo sobre la plasticidad conductual y neuronal inducidas por cocaína.

DISCUSIÓN

Este estudio proporciona la primera evidencia de que se necesita el gen de proencefalina para desarrollar las neuroadaptaciones fundamentales que conducen a la sensibilización psicomotora observada a largo término inducida por cocaína. Así, los ratones que carecen del gen proencefalina no desarrollan sensibilización a las propiedades estimulantes de cocaína sobre la actividad locomotora y en la liberación de dopamina a nivel del NAc. Consistentemente, los cambios moleculares a largo-término inducidos por el tratamiento crónico con cocaína, previamente descritos por otros autores, tales como los aumentos en la expresión de subunidades GluR1 del receptor AMPA en la superficie celular (Boudreau y Wolf, 2005; Boudreau y col., 2007; Ghasemzadeh y col., 2009), la actividad de la vía ERK/CREB (Valjent y col., 2000; 2006; Mattson y col., 2005; Brami-Cherrier y col., 2009; DiRocco y col., 2009; Kim y col., 2011), así como del receptor de TrkB conjuntamente con BDNF (Grimm y col., 2003; Filip y col., 2006; Graham y col., 2007), no fueron observados en el NAc y estriado dorsal de los animales KO luego de cocaína. En coincidencia con estos hallazgos, se observó un aumento persistente en la inmunoreactividad de met-enkefalina en el NAc y el estriado dorsal de animales WT expuestos crónicamente a la droga, así como también una reversión de la plasticidad conductual y neuronal inducida por cocaína después de un pre-tratamiento con NX.

Activación del sistema encefalinérgico por cocaína.

Se postula que los cambios en la expresión génica inducida por psicoestimulantes en determinadas estructuras cerebrales son cruciales para la activación de las respuestas neurobiológicas y de comportamiento subyacentes al proceso adictivo (Berke y Hyman, 2000). Particularmente, alteraciones en la expresión de péptidos opioides (encefalina y dinorfina) representan, entre otros mecanismos, un paso inicial y clave en el desarrollo de la neuroplasticidad observada a largo plazo inducida por las drogas de abuso (Nestler y col., 1993; Nestler, 1997; 2001).

La síntesis de proencefalina a nivel del cuerpo estriado está regulada por los neurotransmisores dopamina, acetilcolina y glutamato (Liste y col., 1999; Wang y McGinty, 1996; Mao y Wang, 2003). Dopamina, al actuar sobre sus receptores específicos D1 y D2, modula la expresión factores de transcripción tales como CREB (Das y col., 1997; Kashihara y col., 1999; Cho y col., 2007), el cual es capaz de inducir la expresión del

ARNm de proencefalina (Bacher y col., 1996; Monnier y Loeffler, 1998). CREB es el principal regulador de la actividad transcripcional en las neuronas accumbales de proyección y es fosforilado por proteín-kinasas, incluyendo a ERK1/2 (Sgambato y col., 1998; Vanhoutte y col., 1999). Se ha reportado que drogas psicoestimulantes, las cuales aumentan el contenido de dopamina en la terminal sináptica, incrementan paralelamente la fosforilación de ERK2/CREB (Valjent y col., 2000; 2005; Carlezon y col., 2005) y la expresión del ARNm de proencefalina y su péptido opioide derivado, met-enkefalina (Hurd y col., 1992; Steiner y col., 1993; Smith y McGinty, 1994; Shi y McGinty, 2006; Assis y col., 2006; 2009; 2011) en áreas del circuito mesocórticolímbico relevantes para la expresión de la sensibilización. En consistencia con estas observaciones, se ha demostrado que la inhibición de la activación de la vía de señalización ERK2/CREB, previene el incremento en el ARNm de proencefalina inducido por psicoestimulantes (Shi y McGinty, 2006). Específicamente, se ha reportado que la exposición crónica a cocaína, la cual incrementa substancialmente los niveles de fosforilación de ERK2/CREB en el NAc y estriado dorsal (Mattson y col., 2005), produce un aumento en los niveles de ARNm de proencefalina en dichas estructuras cerebrales (Branch y col., 1992; Hurd y col., 1992; Mathieu-Kia y Besson, 1998; Spangler y col., 1997). En consistencia con estas observaciones, nuestros resultados demuestran que un tratamiento crónico con cocaína, el cual aumenta progresivamente los niveles de dopamina en el NAc de los animales WT, produce paralelamente un incremento persistente en los niveles de met-enkefalina en áreas que reciben aferencias dopaminérgicas, tales como el NAc y estriado dorsal, sustentando la noción de que el aumento en los niveles de dopamina inducidos por cocaína podrían ser los responsables de incrementar la expresión de enkefalina en estas estructuras cerebrales. Adicionalmente, considerando que se observó un incremento a largo término en los niveles de met-enkefalina, así como también en la activación de ERK2 y el factor de transcripción CREB en el NAc y estriado dorsal proveniente de los animales WT luego de cocaína, es probable que la síntesis de dicho neuropéptido responda a un mecanismo mediado por la activación de esta vía de señalización. Interesantemente, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron un incremento a largo término en los niveles de met-enkefalina en el NAc y CPf después de un tratamiento agudo con anfetamina (Assis y col., 2009; 2011). Este aumento en los niveles de met-enkefalina está mediado por la activación de los

receptores D1/D2 en dichas áreas cerebrales, ya que el bloqueo selectivo de estos receptores impide el aumento en los niveles del neuropéptido inducido por amfetamina. Así, los resultados del presente estudio y las evidencias previas de nuestro laboratorio indican que, tanto un tratamiento crónico o agudo con drogas psicoestimulantes es capaz de producir una activación a largo término del sistema encefalinérgico en áreas del circuito mesocórticolímbico relevantes para la expresión del fenómeno de sensibilización. Dicha activación podría deberse al aumento en los niveles de dopamina y la activación de la vía ERK2/CREB tras la estimulación de los receptores dopaminérgicos en las estructuras cerebrales mencionadas. Adicionalmente, considerando que la síntesis de encefalina inducida por psicoestimulantes puede estar regulada por los receptores μ y δ -opioides (González-Nicolini y col., 2003), es probable que el incremento observado en los niveles de met-enkefalina luego de cocaína, también pueda deberse a un mecanismo de retroalimentación positiva que induce su síntesis.

Finalmente, nuestras observaciones coinciden con otras evidencias que demuestran que la exposición crónica a cocaína produce neuroadaptaciones duraderas en la expresión de determinados productos génicos en áreas que reciben aferencias dopaminérgicas (Hope y col., 1994; Moratalla y col., 1996; Cha y col., 1997), los cuales poseen un rol potencial en el desarrollo de adicción a la droga.

El sistema encefalinérgico facilita el desarrollo de la sensibilización respecto al efecto estimulante motor y la liberación de dopamina en el NAc inducido por cocaína.

Las neuronas dopaminérgicas en el ATV que proyectan hacia el NAc, constituyen la vía dopaminérgica mesolímbica la cual ha sido implicada en los efectos estimulantes y reforzantes de las drogas de abuso, así como en el desarrollo y/o expresión del fenómeno de sensibilización. Encefalina y los receptores opioides se expresan ampliamente dentro de este circuito (Le Merrer y col., 2009; Mansour y col., 1995a). Como se mencionó previamente, dopamina modula la síntesis de proencefalina y péptidos opioides derivados en las áreas comprendidas dentro del circuito mesocorticolímbico (Latimer y col., 1987; Kalivas y Duffy, 1990; Daugé y col., 1992). A su vez, se ha reportado que encefalina regula la actividad dopaminérgica dentro esta vía. Existen evidencias demostrando que encefalina a nivel del ATV favorece la liberación de dopamina en el NAc (Daugé y col., 1992;

Johnson y North 1992), mientras que antagonistas μ -opioides administrados intra-ATV producen una disminución en la neurotransmisión dopaminérgica (Spanagel y col., 1992). En consistencia con esto, estudios farmacológicos que utilizan antagonistas de los receptores opioides, así como también ratones KO para proencefalina y los receptores μ -opioides demostraron la participación del sistema opioide endógeno en diversos comportamientos relacionados con dopamina (Racz y col., 2009; Mathon y col., 2005; Heidbreder y col., 1996; Hummel y col., 2004). En relación a esto, utilizando herramientas farmacológicas se ha demostrado la participación de los receptores μ -opioides y δ -opioides en la liberación de dopamina en el NAc inducida por cocaína (Shippenberg y Elmer, 1998; Van Ree y col., 2000; Shippenberg y Chefer, 2003). En consistencia con estos datos neuroquímicos, evidencias farmacológicas indican un rol para los receptores μ -opioides en el desarrollo de la sensibilización conductual inducida por cocaína (Hummel y col., 2004; Sala y col., 1995; Kim y col., 1997; Smith y col., 2013). En esta línea de evidencia, existen datos indicando que el locus anatómico dentro del circuito mesocorticolímbico donde los receptores μ -opioides modulan la recompensa y la hiperactividad inducida por cocaína es la vía ATV-NAc (Soderman y Unterwald, 2008). A su vez, se ha demostrado que cocaína provoca la liberación de péptidos opioides endógenos, los cuales uniéndose a receptores μ -opioides dentro del NAc modulan los efectos conductuales inducidos por la droga (Soderman y col., 2009). En relación con esto, datos publicados indican un papel prominente para encefalina, así como para los receptores μ -opioides localizados dentro del ATV en las etapas iniciales de la sensibilización (DuMars y col., 1988; Kalivas y col., 1983; Chen y col., 2001). No obstante, teniendo en cuenta que en el presente estudio se observó una prevención completa de la plasticidad conductual y neuronal inducida por cocaína en los animales KO y en aquellos pre-tratados con NX, es probable que encefalina y los receptores μ -opioides tengan un papel crítico no sólo en las áreas dopaminérgicas del cerebro relacionadas con desarrollo de la sensibilización a cocaína, sino también en aquellas que son el sustrato anatómico donde se asientan los procesos asociados a la expresión del fenómeno.

En coincidencia con lo reportado previamente (Berrendero y col., 2005), los resultados de este trabajo de tesis indican que la ausencia del gen que codifica para proencefalina no afecta el tono dopaminérgico a nivel del NAc. Sin embargo, el sistema

encefalínrgico está fuertemente implicado en la expresión de la sensibilización a las propiedades estimulantes de cocaína sobre la liberación de dopamina a nivel del NAc (Figura 26). Paralelamente, se evidenció que el efecto agudo inducido por cocaína sobre la liberación de dopamina en el NAc no se encuentra afectado en los animales KO (Figura 26B). Observaciones similares fueron realizadas por Chefer y col., (2004) en ratones deficientes en el receptor μ -opioide, evidenciándose que la ausencia del receptor no influye sobre el efecto agudo de cocaína sobre la liberación de dopamina a nivel de dicho centro cerebral, no obstante el sistema μ -opioide está involucrado en la sensibilización conductual inducida por la droga (Hummel y col., 2004). Estas observaciones y nuestras evidencias las cuales indican que el efecto estimulante inducido por una dosis aguda de cocaína sobre la actividad motora y liberación de dopamina en el NAc no está alterado en los animales KO (Figuras 25 y 26B), sugieren la participación del sistema μ -opioide/encefalina en los efectos a largo término inducidos por cocaína.

En relación con esto, se ha postulado que uno de los principales cambios a largo plazo inducidos por la administración repetida de cocaína es el aumento en la transmisión dopaminérgica en la vía mesolímbica (Woolverton y Johnson, 1992). La respuesta motora sensibilizada observada a largo término es el resultado, entre otros mecanismos, de un incremento progresivamente mayor en la liberación de dopamina a nivel del NAc (Kalivas y Duffy 1993, Kalivas y Stewart, 1991), evidenciándose un efecto sensibilizado en la transmisión dopaminérgica a nivel de este centro cerebral luego de re-exponer a los animales tratados con cocaína a una dosis desafío con la droga. De acuerdo con resultados reportados previamente (Kalivas y Stewart, 1991; Kalivas y Duffy, 1993), la administración crónica de cocaína en los animales WT indujo la respuesta sensibilizada sobre la liberación de dopamina en el NAc, revelada por un marcado incremento en los niveles extracelulares del neurotransmisor en esta área del cerebro después de una administración desafío con la droga, efecto que no fue observado en los animales KO (Figuras 26A y B). La administración crónica de cocaína, la cual incrementa progresivamente los niveles extracelulares de dopamina en el NAc (Kalivas y Stewart, 1991; Kalivas y Duffy, 1993), puede modificar los niveles de encefalina dentro de esta misma área cerebral (Branch y col., 1992; Hurd y col., 1992; Mathieu-Kia y Besson, 1998; Crespo y col., 2001), sugiriendo que tanto los aumentos inducidos por cocaína en los niveles extracelulares de dopamina, así

como también en los niveles de met-enkefalina, podrían modular conjuntamente los efectos conductuales inducidos por la droga. En consistencia con esta hipótesis, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran una supresión completa de la sensibilización conductual y del efecto estimulante de cocaína sobre la liberación de dopamina en los animales que carecen del gen que codifica para la proencefalina. Este resultado puede ser explicado por la hipótesis de que los niveles incrementados de enkefalina observados tras la administración crónica de cocaína, potenciarían el rol permisivo que posee dicho neuropéptido sobre la liberación de dopamina a nivel del circuito mesolímbico (Dourmap y col., 1990; Spanagel y col., 1992). El mecanismo propuesto para explicar este efecto involucra acciones de enkefalina sobre los receptores opioides localizados en interneuronas GABAérgicas inhibitorias accumbales, lo que provoca una hiperpolarización de las mismas y, consecuentemente, una reducción en la liberación de GABA (Jian y North, 1992; Brundage y Williams, 2002), mecanismo que sería importante para eliminar el tono inhibitorio GABAérgico y facilitar la liberación de dopamina desde la terminal sináptica. Otro mecanismo involucra la activación de receptores μ - y δ -opioides localizados en interneuronas colinérgicas del NAc reduciendo la liberación de acetilcolina (Mulder y col., 1984; Heijna y col., 1990; Britt y McGehee, 2008), y facilitando la liberación de dopamina en dicha área cerebral a través un mecanismo indirecto.

En contraste con las acciones de enkefalina sobre la transmisión dopaminérgica, se ha demostrado que el péptido opioide endógeno dinorfina inhibe la liberación de dopamina en el NAc mediante su unión a los receptores κ -opioides localizados en los botones terminales de las neuronas dopaminérgicas (Spanagel y col., 1990). Esta observación fue confirmada en los ratones *knockout* para el receptor κ -opioide, los cuales demostraron tener niveles basales de dopamina en el NAc mucho mayores a los determinados en los ratones *wild type* (Chefer y col., 2005). En consistencia con estas evidencias y los resultados observados en este trabajo de tesis, estudios que utilizan ratones *knockout* para el gen que codifica para pre-prodinorfina demostraron un incremento de la sensibilización locomotora inducida por cocaína (Bailey y col., 2007). Con relación al receptor δ -opioide, aunque se observó una reducción en el efecto estimulante de cocaína sobre la liberación de dopamina en el NAc proveniente de ratones deficientes en dicho receptor (Chefer y col., 2004), no hay estudios que utilicen esta herramienta genética para evaluar la influencia del receptor δ -

opioide en la sensibilización conductual inducida por cocaína. No obstante, utilizando ratones *knockout* para el receptor μ -opioide, se demostró la participación de este receptor en la sensibilización a cocaína (Hummel y col., 2004; Chefer y col., 2004.). Aunque otros estudios indicaron que la ausencia del gen que codifica para el receptor μ -opioide no tiene un efecto significativo en la sensibilización inducida por cocaína, cabe señalar que estos datos conductuales fueron obtenidos después de períodos de abstinencia cortos a la droga (Lesscher y col., 2005). En relación con esto, hay evidencias que demuestran que NX bloquea la expresión de la sensibilización conductual a psicoestimulantes después de períodos de abstinencia a largo plazo a la droga, pero no a corto plazo (Magendzo y Bustos, 2003), indicando que los receptores μ -opioides estarían involucrados en los efectos a largo término inducidos por los psicoestimulantes. Así, estas evidencias y nuestras observaciones las cuales indican ausencia de plasticidad conductual y neuronal inducida por cocaína en los animales KO, sustentan la noción de que el sistema endógeno μ -opioide/enkefalina tenga un rol prominente en el establecimiento de las neuroadaptaciones de larga duración dentro del NAc que subyacen la expresión de la sensibilización a cocaína.

El sistema encefalinérgico facilita el desarrollo de las neuroadaptaciones moleculares asociadas al fenómeno de sensibilización a cocaína.

La exposición crónica a cocaína aumenta significativamente los niveles de dopamina y también glutamato a nivel del NAc cuando los animales son re-expuestos a una dosis desafío con la droga (Pierce y col., 1996; Vanderschuren y col., 2000). La evidencia muestra que la interacción entre ambos neurotransmisores a nivel de esta área cerebral, es necesaria para la expresión de la sensibilización conductual inducida por los psicoestimulantes (Wolf, 1998; Kim y col., 2001). La activación de la vía ERK tras la administración crónica o aguda de cocaína, (Valjent y col., 2000; 2006; Mattson y col., 2005; DiRocco y col., 2009; Kim y col., 2011) conduce a la activación de determinados eventos bioquímicos y programas transcripcionales necesarios para la expresión del fenómeno de sensibilización conductual (Valjent y col., 2000, 2006; Kim y col., 2011). Se ha demostrado que la fosforilación de ERK2 por cocaína es dependiente de la activación de vías de señalización activadas por dopamina y glutamato: se requiere de la activación conjunta de los receptores dopaminérgicos D1 y glutamatérgicos NMDA para forforilar a

ERK2 a nivel del NAc luego de la exposición a cocaína (Valjent y col., 2000; 2005; Zhang y col., 2004). En coincidencia con lo reportado por otros autores (Mattson y col., 2005; Marin y col., 2009; Kim y col., 2011), nuestros resultados muestran que los animales WT tratados crónicamente con cocaína y que recibieron una dosis desafío con la droga 21 días después del comienzo del tratamiento crónico con la droga, poseen un marcado incremento en los niveles de fosforilación de ERK2 en el NAc y estriado dorsal. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que el aumento de dopamina tras la administración de una dosis desafío con cocaína en los animales WT administrados crónicamente con la droga, conducen a un aumento en la fosforilación de ERK2 a nivel del NAc y estriado dorsal, contribuyendo a la expresión de la sensibilización conductual. Los animales KO tratados crónicamente con cocaína, los cuales no evidenciaron la expresión de la sensibilización conductual y neuroquímica inducida por la droga, no mostraron aumentos significativos en la fosforilación de ERK2 a nivel del NAc o estriado dorsal en comparación a lo observado en los animales WT (Figura 31A y B). Interesantemente, y coincidiendo con lo reportado previamente (Valjent y col., 2000; 2004), ambos genotipos de animales mostraron una marcada fosforilación de ERK2 en el NAc, estriado dorsal y CPf tras la administración aguda de la droga (Figura 32), enfatizando la importancia de encefalina para promover los cambios moleculares observados a largo término que sustentan la expresión de la respuesta sensibilizada a cocaína.

ERK2 regula la expresión génica mediante el control directo e indirecto de la fosforilación de factores de transcripción y componentes de la cromatina. La translocación de ERK2 fosforilada al núcleo celular conduce a la activación del factor de transcripción CREB. La regulación positiva de la vía de señalización ERK/MSK1/CREB ha sido propuesta como un mecanismo post-sináptico subyacente al fenómeno de sensibilización inducido por cocaína (Brami-Cherrier y col., 2005, 2009; Di Rocco y col., 2009; Ferguson y col., 2006). Paralelamente a la activación de ERK2 observada en este estudio en el NAc y estriado dorsal de los ratones WT tratados crónicamente con cocaína (Figura 31), se evidenciaron incrementos significativos en la activación de CREB en fracciones nucleares provenientes de dichas áreas cerebrales (Figura 33). En coincidencia a estas observaciones, otros autores demostraron una estrecha correlación entre la activación de la señalización de ERK2/CREB en el NAc y estriado dorsal y la expresión de la sensibilización conductual

inducida por cocaína (Mattson y col., 2005; DiRocco y col., 2009). Esta observación también se traslada a las alteraciones moleculares a largo término inducidas por anfetamina: los autores Shi y McGhinty; (2007) demostraron una activación sustancial de ERK2 y CREB en el cuerpo estriado dorsal de animales que expresaron la sensibilización conductual inducida por la droga. En consistencia con estas observaciones, los animales KO tratados crónicamente con cocaína, los cuales no mostraron incrementos en ERK2 inducidos por cocaína, no evidenciaron incrementos en la fosforilación de CREB en fracciones nucleares del NAc y estriado (Figura 33A y B).

En relación a esto, se ha demostrado que la estimulación de los receptores μ y δ -opioides involucra, entre otros eventos celulares, la posterior activación de las MAPK, específicamente la vía ERK (Law y col., 2000). Existe evidencia indicando que la administración crónica de agonistas específicos μ y δ -opioide producen un marcado incremento en la fosforilación de ERK2 en el cuerpo estriado, el cual es revertido con un pre-tratamiento con antagonistas opiáceos (NX, naltrindole) (Asensio y col., 2006), demostrando un rol preponderante para los receptores opioides en la regulación de la actividad de ERK2 en una de las principales áreas del circuito mesocorticolímbico relevante para la expresión del fenómeno de sensibilización. A su vez, se ha reportado que los incrementos en los niveles de encefalina en el cuerpo estriado inducido por psicoestimulantes, responden a un mecanismo mediado por la activación de los receptores μ y δ -opioides y la activación de la vía ERK2/CREB (González-Nicolini y col., 2003; Shi y McGinty, 2006). Estas observaciones, conjuntamente a los resultados presentados en este estudio donde no se observó activación de la vía ERK2/CREB inducida por cocaína en los animales KO o pre-tratados con NX (Figuras 31 y 40), indican un posible mecanismo mediado por encefalina a través de su actividad agonística sobre los receptores μ y δ -opioides para activar la vía ERK2/CREB luego de la exposición crónica a la droga, y a su vez, la activación de esta vía podría traducirse en la inducción de la síntesis de proencefalina. En consistencia con esta hipótesis, se demostró un marcado incremento en los niveles de met-encefalina en las mismas áreas donde se evidenció un marcado aumento en la fosforilación de ERK2 luego del tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización conductual (Figuras 23 y 31). Así, estas evidencias indican que encefalina sería un componente más dentro del circuito mesocorticolímbico que interacciona con

dopamina y glutamato para promover la activación de la vía ERK2/CREB, lo cual se ha demostrado que representa uno de los principales cambios moleculares a largo término que sustenta la expresión de la respuesta sensibilizada a cocaína.

En este contexto, la activación de ERK2 también se ha atribuido a la estimulación del receptor TrkB por su agonista BDNF. Numerosas evidencias han implicado a esta neurotrofina en las neuroadaptaciones dentro del NAc, VTA y la CPf subyacentes a la sensibilización conductual inducida por cocaína y la reinstalación de la conducta de preferencia a un sitio asociado con la droga (McGinty y col., 2010). La exposición crónica a cocaína produce importantes modificaciones en la vía de señalización de BDNF/TrkB dentro del circuito mesocorticolímbico (Grimm y col., 2003; Crooks y col., 2010). Se ha postulado que BDNF provoca adaptaciones neuronales a largo plazo mediante el control de la capacidad de respuesta de las neuronas dopaminérgicas que proyectan al NAc (Guillin y col., 200; Le Foll y col., 2005) y el aumento en la activación de TrkB en las terminales axonales de dichas neuronas, podrían promover una mayor liberación de dopamina (Seroogy y col., 1994) contribuyendo a las alteraciones conductuales inducidas por cocaína (Horger y col., 1999; Pierce y col., 1999; Grimm y col., 2003). Es por esto que niveles elevados de BDNF se asocian con aumento de la neurotransmisión dopaminérgica, la activación motora y las conductas dirigidas a un objetivo específico, mientras que la actividad reducida de la señalización BDNF/TrkB dentro del circuito ATV-NAc da lugar a una capacidad atenuada de cocaína para inducir cambios neuroadaptativos a nivel del NAc que promueven la adicción a la droga (Bahi y col., 2008; Lobo y col., 2011). Además se ha demostrado que el aumento de la expresión de BDNF inducido por cocaína en esta vía neuronal es el responsable de determinados cambios en la morfología de las espinas dendríticas a nivel del NAc luego de la exposición crónica a la droga (Poo y col., 2001; Schuman y col., 1999). Numerosos estudios demostraron una asociación entre los cambios en la señalización de BDNF/TrkB a nivel del NAc y la sensibilización conductual inducida por cocaína (Grimm y col., 2003; Filip y col., 2006; Crooks y col., 2010). En coincidencia con estas observaciones, los resultados presentados en este trabajo de tesis indican un aumento en los niveles de BDNF en el NAc, CPf y ATV de los animales WT tratados crónicamente con cocaína y re-expuestos a una dosis desafío con la droga. Nuestros datos, muestran un aumento en los niveles de BDNF principalmente dentro del NAc core; lo cual

discrepa con las observaciones realizadas por los autores Filip y col., (2006), quienes evidenciaron un aumento en los niveles del ARNm para BDNF en el NAc shell, pero no en el NAc core luego de un tratamiento crónico con cocaína. La discrepancia entre estos resultados puede deberse a la especie de roedor utilizada y/o al paradigma de tratamiento implementado, ya que los autores del trabajo mencionado evaluaron la expresión de BDNF luego de un período de abstinencia corto luego de cocaína. Muchas veces resulta necesario que transcurran períodos de tiempo en ausencia de droga más largos (14-21 días) para evidenciar cambios neuroquímicos y moleculares en un área cerebral determinada, los cuales no son observados luego de períodos de abstinencia cortos a la droga (Pierce y Kalivas, 1997; Magdenzo y Bustos, 2003)

En este trabajo de tesis, se evidenció que los animales KO tratados crónicamente con cocaína, no mostraron aumentos en los niveles de BDNF en el NAc en comparación con lo observado en los animales WT que recibieron el mismo tratamiento (Figura 29B). Curiosamente, se observó un aumento en los niveles de BDNF en la CPf de los animales WT y KO tratados crónicamente con cocaína en comparación con los animales WT tratados con vehículo (Figura 29C). Del mismo modo, un tratamiento previo con NX suprimió los efectos de cocaína sobre los niveles de BDNF en el NAc y VTA pero no en la CPf (Figuras 37B, 39A y 39B). En conjunto, estos hallazgos indican un requerimiento de encefalina para inducir cambios en la señalización BDNF/TrkB específicamente dentro de la vía mesolímbica luego de un tratamiento crónico con cocaína. Este resultado es consistente con el principal aumento en los niveles de met-encefalina observados en el NAc de los animales tratados crónicamente con la droga. En el estriado dorsal, los niveles de met-encefalina siguieron el mismo perfil que el observado en el NAc, aunque no se observó ningún cambio en los niveles de BDNF en esta área cerebral proveniente de los animales WT o KO tratados crónicamente con cocaína y re-expuestos a una dosis desafío con la droga (Figura 29A). Sin embargo, sí se observó un aumento en la fosforilación de TrkB en los animales WT que recibieron dicho tratamiento, pero no en los animales KO o pre-tratados con NX, después de la administración crónica de cocaína (Figuras 30 y 38A). Este efecto podría atribuirse a una activación del receptor TrkB independiente de BDNF (Jeanneteau y col., 2008; Rantamäki y col, 2011) o una trans-activación del receptor (Lee y col, 2001;

Rajagopal y col., 2004; Huang y col., 2008; 2010), con la posible participación de un mecanismo mediado por los receptores opioides.

La falta de aumento inducido por cocaína sobre los niveles de BDNF en el NAc de los animales KO no puede atribuirse a una deficiencia o impedimento en la síntesis de la neurotrofina en dichos animales, ya que pudieron evidenciarse incrementos de la misma a nivel de la CPf (Figura 29C). La ausencia de incrementos en los niveles de BDNF en los animales KO tratados crónicamente con cocaína, sugiere que por algún mecanismo la ausencia de encefalina ejerce un impedimento en la liberación de BDNF de las terminales axonales glutamatérgicas que proyectan desde la CPf hacia el NAc, o que, posiblemente, la falta de encefalina modifique la homeostasis de glutamato, ejerciendo indirectamente una alteración en la liberación de la neurotrofina hacia el NAc. En relación a la primera suposición, la evidencia indica que met-enkefalina y BDNF se almacenan en vesículas de centro denso, orgánulos que participan en la secreción de neuropéptidos (Cheng y col., 1995). Estudios recientes confirman que BDNF y met-enkefalina se almacenan en DCV separadas que se ubican en las terminales de las neuronas que inervan el NAc (Dieni y col., 2012). Esto indica que no sería probable algún tipo de discapacidad en los mecanismos de liberación de BDNF en los animales KO que explique la falta de aumento en los niveles de BDNF inducidos por cocaína a nivel del NAc, ya que ambos neuropéptidos se encuentran diferencialmente almacenados y su liberación es independiente. Con respecto a la segunda hipótesis, se sabe que encefalina al actuar sobre receptores δ -opioides pre-sinápticos, tiene un rol permisivo sobre la liberación de glutamato (Billet y col., 2004). Además existe evidencia indicando que análogos de encefalina con alta afinidad por los receptores δ -opioides facilitan la liberación de glutamato inducida por psicoestimulantes a nivel del cuerpo estriado, efecto que es revertido por el antagonista selectivo δ -opioide naltrindole (Rawls y McGinty, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que la CPf es la fuente principal de BDNF hacia el NAc y su liberación es dependiente de la actividad glutamatérgica de dicha vía (Kohara y col., 2001; Balkowiec y Katz, 2002; Carvalho y col., 2008; Lessman y col., 1998). A su vez, es ampliamente aceptado que la expresión de la sensibilización a cocaína se acompaña de un aumento en la liberación de glutamato al re-exponer a los animales a la droga (Pierce y col., 1996). Considerando estas evidencias, y teniendo en cuenta que los animales KO no mostraron sensibilización conductual a cocaína y, a su vez,

no evidenciaron la activación de los eventos moleculares dependientes de dopamina y glutamato a nivel del NAc asociados al fenómeno, es probable que la ausencia de encefalina afecte la liberación de glutamato en los animales KO tratados crónicamente con cocaína y re-expuestos a la droga, alterando consecuentemente la liberación de BDNF a nivel de este centro cerebral.

En relación con esto, Li y Wolf (2011) demostraron que la inyección exógena de BDNF intra-NAc, facilita la inserción de receptores AMPA en las células de dicho núcleo 30 min post-inyección, demostrando además que dicho efecto depende de la activación de ERK2. Estas observaciones son consistentes con los resultados presentados en este trabajo de tesis donde se muestra una falla en la fosforilación de ERK2, expresión de receptores AMPA y activación de la vía BDNF/TrkB luego de cocaína en el NAc y estriado dorsal de los animales KO. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de una estrecha relación entre los aumentos en los niveles de BDNF y alteraciones en la expresión de AMPA inducidos por cocaína, los cuales fueron observados en el NAc y estriado dorsal de los animales WT luego de un tratamiento crónico con cocaína que induce sensibilización a la droga (Figuras 29, 31 y 34).

Numerosas evidencias sustentan el rol de los receptores AMPA en la sensibilización a cocaína (Churchill y col., 1999; Boudreau y col., 2005), constituyendo una de las principales neuroadaptaciones asociadas al fenómeno. Nuestros resultados en coincidencia con lo observado por otros autores (Ferrario y col., 2010; Kim y col., 2009), muestran un incremento en los niveles de dicho receptor en el NAc y estriado dorsal de los ratones WT tratados crónicamente con cocaína y re-expuestos a una dosis desafío con la droga (Figura 34). La activación de la vía ERK ha sido implicada en el tráfico de los receptores AMPA en neuronas estriatales (Zhu y col, 2002; 2005). En relación a esto, nuestros resultados son consistentes con datos publicados que demuestran que los animales sensibilizados a cocaína poseen incrementos sustanciales en la fosforilación de ERK2 y en la inserción de receptores AMPA en el NAc (Boudreau y col., 2007; Shumman y Yaka, 2009), sugiriendo que la señalización de ERK es directamente responsable de los incrementos observados en la expresión de receptores AMPA en esta área cerebral.

En este contexto, la ausencia de aumentos en BDNF, así como también la falta de sensibilización al efecto estimulante de cocaína sobre la liberación de dopamina en los

animales KO, remarcan el importante rol tanto de encefalina como de BDNF, los cuales interaccionan con dopamina y glutamato dentro del NAc, para generar la plasticidad neuronal que sustentan la respuesta sensibilizada al efecto estimulante de cocaína sobre la activación motora.

El pre-tratamiento con NX previene el desarrollo del fenómeno de sensibilización inducido por cocaína y eventos moleculares asociados a nivel del NAc.

Existe evidencia farmacológica demostrando que los péptidos opioides derivados de proencefalina tienen alta afinidad por receptores δ -opioides y también poseen una buena afinidad por receptores μ -opioides (Mansour y col., 1995b). Considerando que en este estudio se demostró un incremento persistente en la inmunoreactividad de met-enkefalina inducida por cocaína en el NAc y estriado dorsal, se especuló que el bloqueo de los receptores opioides aboliría el rol facilitatorio de encefalina sobre el fenómeno de sensibilización inducido por cocaína y los cambios moleculares a largo término asociados al fenómeno.

En consistencia con otros estudios farmacológicos, NX pudo bloquear el desarrollo del fenómeno de sensibilización conductual inducido por cocaína (Figura 35), confirmando la participación de los receptores opioides en la sensibilización conductual inducida por la droga (Kim y col., 1997; Hummel y col., 2004; Sala y col., 1995; Heiderberer y col., 1996; Shoederer y col., 2007). Cabe señalar que los estudios farmacológicos citados así como aquellos que utilizan herramientas genéticas, no proporcionan evidencia sobre los mecanismos neuronales que expliquen cómo los antagonistas opiáceos (o la ausencia de los receptores opioides) revierten el fenómeno de sensibilización, siendo nuestros resultados los primeros en aportar evidencia concreta sobre la influencia de encefalina y los receptores opioides en la plasticidad conductual y neuronal inducida por cocaína.

En relación con esto, la asombrosa similitud entre los resultados obtenidos en los animales pre-tratados con NX o KO administrados crónicamente con cocaína, sustentan la noción de que encefalina al interactuar con los receptores μ - y δ -opioides dentro de la vía mesolímbica es capaz de inducir las neuroadaptaciones de larga duración que subyacen la expresión de la sensibilización a cocaína. No obstante, dado el papel modulador ejercido por los receptores μ -opioides dentro del circuito ATV-NAc sobre los efectos conductuales

inducidos por cocaína (Soderman y col., 2008; Simons y col., 2009) y la dosis de NX utilizada en esta tesis (Martin, 1983; Gutstein y Akil, 2001), es probable que el papel permisivo de encefalina en la plasticidad conductual y neuronal inducida por cocaína observado en este estudio, pueda ser atribuido principalmente a la acción de dicho neuropéptido sobre los receptores μ -opioides. En apoyo de esta hipótesis, hay pruebas que demuestran que la activación de los receptores μ -opioides induce cambios neuronales persistentes mediante la modulación de la expresión de los receptores AMPA en las sinapsis hipocampales proveniente de animales que expresan sensibilización conductual dependiente del contexto inducida por morfina (Billa y col., 2009; Xia y col., 2011). Además, la abstinencia a morfina o heroína induce incrementos en la fosforilación de ERK2/CREB y de subunidades GluR1 del receptor AMPA en áreas del cerebro relacionadas con el sistema de recompensa (Edwards y col., 2009; Haghparast y col., 2014). Estas evidencias señalan la importancia de un mecanismo molecular común mediado por el sistema endógeno μ -opioides/encefalina para inducir la plasticidad neuronal que subyace a los efectos conductuales observados a largo término inducidos por opiáceos y psicoestimulantes. No obstante, teniendo en cuenta que encefalina posee alta afinidad por los receptores δ -opioides, que existen pruebas farmacológicas que involucran a dicho receptor en la sensibilización inducida por cocaína (Heidbreder y col., 1996), y que se ha descrito que la activación del mismo produce incrementos en la fosforilación de ERK2 (Asensio y col., 2006; Law y col., 2000), no puede descartarse que encefalina a través de su actividad agonística sobre el receptor δ -opioides también pueda mediar su efecto permisivo sobre la plasticidad conductual y neuronal inducida por cocaína.

En relación a esto, los resultados presentados en este estudio demostraron que la ausencia de encefalina o un pre-tratamiento con NX previnieron los cambios plásticos inducidos por cocaína a nivel del NAc. Sin embargo, a diferencia de lo observado en los animales KO, el pre-tratamiento con NX no fue capaz de revertir algunos de los cambios moleculares inducidos por cocaína a nivel del estriado dorsal. Estas diferencias pueden estar relacionadas con las diferentes estrategias utilizadas para estudiar el rol que posee encefalina y los receptores opioides en la plasticidad neuronal inducida por cocaína en áreas del circuito mesocorticolímbico. Los datos obtenidos muestran que la estrategia vía manipulación genética utilizando los ratones KO previno los incrementos observados en los

niveles de CREB y AMPA inducidos por cocaína en el estriado dorsal (Figuras 33 y 34), pero en contraste con este resultado, un pre-tratamiento con NX no fue efectivo para suprimir dichos cambios (Figuras 40 y 41). Discrepancias entre resultados utilizando herramientas farmacológicas (antagonistas opiáceos) o genéticas (ratones *knockout*) en el estudio de la influencia del SOE en los efectos inducidos por cocaína u otras drogas de abuso han sido observadas previamente (Hummel y col., 2004; Kieffer y col., 2002). Estas diferencias pueden deberse a que en los modelos farmacológicos, el bloqueo de la actividad de un receptor se ajusta a un protocolo de administración de la droga antagonista. En cambio, los modelos genéticos poseen la ventaja de que la ausencia del receptor y/o péptido es permanente permitiendo clarificar determinados resultados los cuales se encuentran enmascarados utilizando la estrategia farmacológica. Con relación a esto, las desigualdades en el efecto del pre-tratamiento con NX en los cambios moleculares inducidos por cocaína a nivel del NAc y estriado dorsal, también puede deberse a las diferencias neuroanatómicas entre ambas áreas cerebrales (Vanderschuren y col., 2000) y los contrastes en cuanto a la distribución y densidad de receptores opioides en el estriado dorsal en comparación a las observadas en el NAc (Voorn y col., 1996; Mansour y col., 1995a), pudiendo esto traducirse en un efecto diferente mediado por NX sobre dichas estructuras cerebrales y repercutiendo finalmente en la reversión de los cambios a largo término inducidos por cocaína.

En conclusión, este estudio demuestra que encefalina es esencial en el desarrollo de neuroadaptaciones clave a nivel del NAc que sustentan la sensibilización a cocaína observada a largo término. Nuestros resultados proveen evidencias concretas que aportan a la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen la expresión fenómeno. Consistentemente, la ausencia de plasticidad conductual y neuronal inducida por cocaína en los ratones KO y pre-tratados con NX, remarcan el importante rol que resulta de la interacción entre dopamina, glutamato así como también BDNF y el sistema de proencefalina endógeno a nivel del NAc para mediar las alteraciones neuroquímicas y moleculares que gobiernan la sensibilización conductual a cocaína. A su vez, nuestro estudio subraya la relevancia del uso de herramientas genéticas para develar la contribución específica de un sistema endógeno en los efectos inducidos por dicha droga.

Las alteraciones en los patrones de expresión de genes inducidos por una droga a lo largo de los sistemas de recompensa del cerebro son un mecanismo potencial para mediar la adicción a las mismas y serían las responsables de las modificaciones neuroquímicas y moleculares que caracterizan a la adicción (Nestler, 2001), resultando la carga genética individual en un factor de vulnerabilidad preponderante en el desarrollo de la adicción (Jean Bierut, 2011; Vink y col., 2005). Polimorfismos en genes que codifican para diversos componentes del SOE han sido implicados en la predisposición a la adicción a cocaína y opiáceos (Kreek y col., 2005). Vinculado con este concepto, nuestro estudio resulta relevante para entender cómo modificaciones en el sistema de proencefalina endógeno, ya sea debido a polimorfismo genéticos (Kreek y col., 2005; Yuferov y col., 2010; Nikoshkov y col., 2008) o factores ambientales (Barron y col., 1990) puede influir en la vulnerabilidad a la adicción a psicoestimulantes. Además, nuestros datos proporcionan información sobre los mecanismos neurobiológicos que explican la efectividad de los antagonistas opiáceos en el tratamiento de la adicción a cocaína, sustentando su utilidad como terapia para este trastorno (Schmitz y col., 2009; Comer y col., 2013; Mooney y col., 2013).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca C, Albrecht U, Spanagel R (2002). Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9026–9030.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner J M, Acheson A L, Lindsay R M and Wiegand SJ (1997) Anterograde transport of brain- derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 393:856–860.
- Altar CA, Siuciak JA, Wright P, Ip NY, Lindsay RM, Wiegand SJ (1994) In situ hybridization of *trkB* and *trkC* receptor mRNA in rat forebrain and association with high-affinity binding of [125I] BDNF, [125I] NT-4/5 and [125I]NT-3. *Eur J Neurosci.* 1; 6(9):1389-405.
- Ambrose-Lanci LM, Peiris NB, Unterwald EM, Van Bockstaele EJ (2008) Cocaine withdrawal-induced trafficking of delta-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Brain Res* 1210: 92–102.
- Angulo JA, McEwen BS (1994) Molecular aspects of neuropeptide regulation and function in the corpus striatum and nucleus accumbens. *Brain Res Rev* 19:1-28.
- Asensio VJ, Miralles A, García-Sevilla J (2006) Stimulation of mitogen-activated protein kinase kinases (MEK1/2) by mu-, delta- and kappa-opioid receptor agonists in the rat brain: regulation by chronic morphine and opioid withdrawal. *Eur J Pharmacol* 539:49–56
- Assis M A, Hansen C, Lux-Lantos V, Cancela LM (2009) Sensitization to amphetamine occurs simultaneously at immune level and in met-enkephalin of the nucleus accumbens and spleen: an involved NMDA glutamatergic mechanism. *Brain Behav. Immun.* 23, 464–473.
- Assis MA, Collino C, Figuerola Md, Sotomayor C, Cancela LM (2006) Amphetamine triggers an increase in met-enkephalin simultaneously in brain areas and immune cells. *J Neuroimmunol* 178:62–75.
- Assis MA, Pacchioni A M, Collino C, Paz M C, Sotomayor C, Basso AM, Cancela, L M (2008) A dopamine mechanism is implied in the acquisition and expression of amphetamine and stress-induced effects observed in the lymphocyte subpopulations. *Eur. J. Pharmacol.* 584, 405–414.
- Assis MA, Valdomero A, García-Keller C, Sotomayor C, Cancela LM (2011) Decrease of lymphoproliferative response by amphetamine is mediated by dopamine from the nucleus accumbens: influence on splenic met-enkephalin levels. *Brain Behav Immun.* 25(4):647-57.
- Azaryan AV, Clock BJ, Rosenberger JG, Cox BM (1998) Transient upregulation of mu opioid receptor mRNA levels in nucleus accumbens during chronic cocaine administration. *Can J Physiol Pharmacol* 76: 278–283.
- Bacher B, Wang X, Schulz S, Holtt V (1996) Induction of proenkephalin gene expression in cultured bovine chromaffin cells is dependent on protein synthesis of AP-1 proteins. *J Neurochem* 66:2264–2271.
- Bahi A, Boyer F, Chandrasekar V, Dreyer J-L (2008) Role of accumbens BDNF and TrkB in cocaine-induced psychomotor sensitization, conditioned-place preference, and reinstatement in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 199:169–182
- Bailey A, Yoo JH, Racz I, Zimmer A, Kitchen I (2007). Preprodynorphin mediates locomotion and D2 dopamine and mu-opioid receptor changes induced by chronic ‘binge’ cocaine administration. *J Neurochem* 102: 1817-1830.
- Baker DA, Shen H, and Kalivas PW (2002) Cystine/glutamate exchange serves as the source for extracellular glutamate: modifications by repeated cocaine administration. *Amino Acids* 23:161–162.
- Balkowiec A, Katz DM (2002) Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci* 22:10399–10407.
- Bardo MT, Bevins RA (2000) Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology* 153: 31–43.
- Barron BA, Pierzchala K, Loon GR (1990) Source of Stress-Induced Increase in Plasma Met-Enkephalin in Rats: Contribution of Adrenal Medulla and/or Sympathetic Nerves. *J Neuroendocrinol.* 2(3):381-8.

- Beckstead MJ, Grandy DK, Wickman K, Williams JT (2004) Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron* 42(6):939-46.
- Belluzzi JD, Stein L (1977) Enkephalin may mediate euphoria and drive reduction reward. *Nature (Lond)* 266:556-558.
- Berhow MT, Hiroi N, Nestler EJ (1996) Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J Neurosci* 16:4707-4715.
- Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25:515-532.
- Berrendero F, Mendizábal V, Robledo P, Galeote L, Bilkei-Gorzo A, Zimmer A, Maldonado R (2005) Nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and physical dependence are decreased in mice lacking the preproenkephalin gene. *J Neurosci* 25:1103-1112
- Billa SK, Sinha N, Rudrabhatla SR, Morón JA (2009) Extinction of morphine-dependent conditioned behavior is associated with increased phosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors at hippocampal synapses *Eur J Neurosci*. 29(1):55-64.
- Billet F, Dourmap N, Costentin J (2004) Involvement of corticostriatal glutamatergic terminals in striatal dopamine release elicited by stimulation of delta-opioid receptors. *Eur J Neurosci* 20:2629-2638.
- Bodnar RJ (2009) Endogenous opiates and behavior:2008. *Peptides* 30(12):2432-79.
- Bolaños C , Nestler EJ (2004) Neurotrophic mechanisms in drug addiction. *Neuromolecular Med* 5:69-83
- Boudreau AC, Reimers JM, Milovanovic M, Wolf ME (2007) Cell surface AMPA receptors in the rat nucleus accumbens increase during cocaine withdrawal but internalize after cocaine challenge in association with altered activation of mitogen-activated protein kinases. *J Neurosci* 27:10621-10635
- Boudreau AC, Wolf ME (2005) Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 25:9144-9151
- Boutrel B (2008) A neuropeptide-centric view of psychostimulant addiction. *Br J Pharmacol*. 154(2):343-57.
- Bowers MS, McFarland K, Lake RW, Peterson YK, Lapish CC, Gregory ML, Lanier SM, Kalivas PW (2004) Activator of G protein signaling 3: a gatekeeper of cocaine sensitization and drug seeking. *Neuron* 42:269-281.
- Bradbury AF, Smyth DG, Snell CR, Birdsall NJM, Hulme EC (1976) C-fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors. *Nature (Lond)* 260:793-795.
- Brady JV (1991). Animal models for assessing drugs of abuse. *Neurosci Biobehav Rev* 15: 35-43.
- Brami-Cherrier K, Roze E, Girault J , Betuing S, Caboche J (2009) Role of the ERK/MSK1 signaling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J Neurochem* 108:1323-1335
- Brami-Cherrier K, Valjent E, Hervé D, Darragh J, Corvol JC, Pages C A, SJ, Simon AJ, Girault JA CJ (2005) Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *J Neurosci* 25:11444 -11454.
- Branch AD, Unterwald EM, Lee SE, Kreek M (1992) Quantitation of preproenkephalin mRNA levels in brain regions from male Fischer rats following chronic cocaine treatment using a recently developed solution hybridization assay. *Brain Res Mol Brain Res* 14:: 231-238.
- Britt JP, McGehee DS (2008) Presynaptic opioid and nicotinic receptor modulation of dopamine overflow in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 28:1672-1681
- Brundege JM, Williams JT (2002) Differential modulation of nucleus accumbens synapses. *J Neurophysiol* 88:142-151
- Carlezon Jr WA, Duman RS, Nestler E J (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci*. 28, 436-445.

- Carvalho AL, Caldeira MV, Santos SD, Duarte CB. (2008). Role of brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *Br. J. Pharmacol.* 153, S310–S324.
- Cha X-Y, Pierce RC, Kalivas PW, Mackler SA (1997) NAC-1, a rat brain mRNA, is increased in the nucleus accumbens three weeks after chronic cocaine self-administration. *J Neurosci* 17:6864–6871.
- Chefer VI, Czyzyk T, Bolan EA, Moron J, Pintar JE, Shippenberg TS (2005) Endogenous kappa-opioid receptor systems regulate mesoaccumbal dopamine dynamics and vulnerability to cocaine. *J Neurosci* 25: 5029–5037.
- Chefer VI, Kieffer BL, Shippenberg TS (2004) Contrasting effects of mu opioid receptor and delta opioid receptor deletion upon the behavioral and neurochemical effects of cocaine. *Neuroscience* 127: 497-503.
- Chefer VI, Morón JA, Hope B, Rea W, Shippenberg TS (2000) Kappa-opioid receptor activation prevents alterations in mesocortical dopamine neurotransmission that occur during abstinence from cocaine. *Neuroscience* 101:619–627.
- Chefer V, Thompson A, Zapata A, Shippenberg T (2009) An overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci.* CHAPTER: Unit7.11-35
- Chen JC, Liang KW, Huang EY (2001) Differential effects of endomorphin-1 and -2 on amphetamine sensitization: neurochemical and behavioral aspects. *Synapse* 39(3):239-48.
- Chen LF, Greene WC (2004) Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:392–401.
- Chen NH, Reith ME (1994) Autoregulation and monoamine interactions in the ventral tegmental area in the absence and presence of cocaine: a microdialysis study in freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 271(3):1597-610.
- Cheng PY, Svingos AL, Wang H, Clarke CL, Jenab S, Beczkowska IW, Inturrisi CE and Pickel VM (1995) Ultrastructural immunolabeling shows prominent presynaptic vesicular localization of delta-opioid receptor within both enkephalin- and nonenkephalin-containing axon terminals in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *J Neurosci* 15:5976–5988.
- Cheramy A, Leviel V, Glowinski J (1981) Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289(5798):537-42.
- Cho D I, Quan W, Oak M H, Choi H J, Lee, KY, Kim K M (2007) Functional interaction between dopamine receptor subtypes for the regulation of c-fos expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 1113–1118.
- Choe E S, Chung K T, Mao L, Wang JQ (2002) Amphetamine increases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and transcription factors in the rat striatum via group I metabotropic glutamate receptors. *Neuropsychopharmacology* 27: 565–575
- Comer SD, Mogali S, Saccone PA, Askalsky P, Martinez D, Walker EA, Jones JD, Vosburg SK, Churchill L, Swanson CJ, Urbina M, Kalivas PW (1999) Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J Neurochem* 72:2397–2403.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci.* 17(7):2295-313
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH (1996) *En: The biochemical basis of neuropharmacology.* New York, Oxford University Press.
- Comer SD, Mogali S, Saccone PA, Askalsky P, Martinez D, Walker EA, Jones JD, Vosburg SK, Cooper ZD, Roux P, Sullivan MA, Manubay JM, Rubin E, Pines A, Berkower EL, Haney M, Foltin R (2013). Effects of acute oral naltrexone on the subjective and physiological effects of oral d-amphetamine and smoked cocaine in cocaine abusers. *Neuropsychopharmacology.*, 38(12), 2427–38.

- Crespo JA, Manzanares J, Oliva JM, Corchero J, Palomo T, Ambrosio E (2001) Extinction of cocaine self-administration produces a differential time-related regulation of proenkephalin gene expression in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 25:185–194
- Crooks KR, Kleven DT, Rodriguiz RM, Wetsel WC, McNamara JO (2010) TrkB signaling is required for behavioral sensitization and conditioned place preference induced by a single injection of cocaine. *Neuropharmacology* 58:1067–1077
- Das S, Grunert M, Williams L, Vincent S R (1997) NMDA and D1 receptors regulate the phosphorylation of CREB and the induction of c-fos in striatal neurons in primary culture. *Synapse* 25, 227–233.
- Daugé V, Kalivas PW, Duffy T, Roques BP (1992) Effect of inhibiting enkephalin catabolism in the VTA on motor activity and extracellular dopamine. *Brain Res.* 25; 599(2):209-14
- De Jong IEM, Steenbergen PJ, de Kloet ER (2009) Behavioral sensitization to cocaine: cooperation between glucocorticoids and epinephrine. *Psychopharmacology (Berl)* 204:693–703
- Di Chiara G, Acquas E, Tanda G, Cadoni C (1993) Drugs of abuse: biochemical surrogates of specific aspects of natural reward? *Biochem Soc Symp* 59:65-81.
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 1067–1080.
- Di Chiara G, Imperato A (1998) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system on freely moving rats. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A* 85(14):5274-5278.
- Di Chiara G, Tanda G, Frau R, Carboni E (1993) On the preferential release of dopamine in the nucleus accumbens by amphetamine: further evidence obtained by vertically implanted concentric dialysis probes. *Psychopharmacology*, 112: 398–402.
- Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu M, Deogracias R, Gundelfinger E, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde YA (2012) BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol* 196:775–788
- DiRocco DP, Scheiner ZS, Sindreu CB, Chan GC-K, Storm DR (2009) A role for calmodulin-stimulated adenylyl cyclases in cocaine sensitization. *J Neurosci* 29:2393–2403
- Dourmap N, Michael-Titus A, Costentin J (1990) Local enkephalins tonically modulate dopamine release in the striatum: a microdialysis study. *Brain Res*, 524 153-155 *Eur J Neurosci.* 20(10):2629-38.
- DuMars LA, Rodger LD, Kalivas PW (1988) Behavioral cross-sensitization between cocaine and enkephalin in the A10 dopamine region. *Behav Brain Res* 27:87–91.
- Edwards S, Graham DL, Bachtell RK, Self DW.(2007) Region-specific tolerance to cocaine-regulated cAMP-dependent protein phosphorylation following chronic self-administration. *Eur J Neurosci.*25(7):2201-13
- Edwards S, Graham DL, Whisler KN, Self DW (2009) Phosphorylation of GluR1, ERK, and CREB during spontaneous withdrawal from chronic heroin self-administration. *Synapse.*63(3):224-35.
- Esparza MA, Bollati F, Garcia-Keller C, Virgolini MB, Lopez LM, Brusco A, Shen H-W, Kalivas PW, Cancela LM (2012) Stress-induced sensitization to cocaine: actin cytoskeleton remodeling within mesocorticolimbic nuclei. *Eur J Neurosci* 36:3103–3117
- Everitt BJ, Belin D, Economidou D, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW (2008) Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci.* Oct 12; 363(1507):3125-35.
- Fallon JH, Leslie FM (1986) Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 249, 293-336.
- Feigenbaum JJ, Howard SG (1997) Effects of naloxone on amphetamine induced striatal dopamine release in vivo : a microdialysis study. *Life Sci* 60: 1659–1668.

- Ferguson SM, Fasano S, Yang P, Brambilla R, Robinson TE (2006) Knockout of ERK1 enhances cocaine-evoked immediate early gene expression and behavioral plasticity. *Neuropsychopharmacology* 31:2660 – 2668.
- Ferrario CR, Li X, Wang X, Reimers JM, Uejima JL, Wolf ME (2010) The role of glutamate receptor redistribution in locomotor sensitization to cocaine. *Neuropsychopharmacology* 35:818–833
- Filip M, Faron-Górecka A, Kuśmider M, Gołda A, Frankowska M, Dziedzicka-Wasylewska M (2006) Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. *Brain Res* 1071:218–225
- Franklin K, Paxinos G (2007) *The Mouse Brain in stereotaxis coordinates*. Third edition. Elsevier. New York
- Gao WY, Lee TH, King GR, Ellinwood EH (1998) Alterations in baseline activity and quinpirole sensitivity in putative dopamine neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area after withdrawal from cocaine pretreatment. *Neuropsychopharmacology*. 18(3):222-32.
- Garzón M, Pickel VM (2002) Ultrastructural localization of enkephalin and mu-opioid receptors in the rat ventral tegmental area. *Neuroscience*. 114(2):461-74.
- Garzón, M, Pickel, VM (2001) Plasmalemma mu-opioid receptor distribution mainly in non-dopaminergic neurons in the rat ventral tegmental area. *Synapse* 41, 311-328.
- Gerfen, CR (1985) The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J. Comp. Neurol* 236: 454–456.
- Ghasemzadeh MB, Permenter LK, Lake R, Worley PF, Kalivas PW (2003) Homer1 proteins and AMPA receptors modulate cocaine-induced behavioural plasticity. *Eur J Neurosci* 18:1645–1651.
- Ghasemzadeh MB, Vasudevan P, Mueller C, Seubert C and Mantsch, J.R. (2009) Region specific alterations in glutamate receptor expression and subcellular distribution following extinction of cocaine self-administration. *Brain Res* 1267:89–102.
- Girault J-A, Valjent E, Caboche J, Hervé D (2007) ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 7:77–85
- Goeders NE, Lane JD, Smith JE (1984) Self-administration of methionine enkephalin into the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 20:451–455.
- Goldstein A, Fischli W, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L (1981) Porcine pituitary dynorphin: Complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7219–7223.
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. (1979) Dynorphin- (1–13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6666–6670.
- Gonzalez-Nicolini MV, Berglind W, Cole KS, Keogh CL, McGinty JF (2003) Local μ and δ opioid receptors regulate amphetamine-induced behavior and neuropeptide mRNA in the striatum. *Neuroscience* 121:387–98.
- Gorosito SV, Cambiasso MJ (2008) Axogenic effect of estrogen in male rat hypothalamic neurons involves Ca(2+), protein kinase C, and extracellular signal-regulated kinase signaling. *J Neurosci Res* 86:145–57.
- Graham DL, Edwards S, Bachtell RK, DiLeone RJ, Rios M, Self DW (2007) Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nat Neurosci* 10:1029–1037
- Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su T-P, Shaham Y (2003) Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *J Neurosci* 23:742–747
- Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P (2001) BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* 411:86–89
- Gutstein HB, Akil H (2001) Opioid analgesics. In: Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. McGraw-Hill, New York pp569-619.

- Haghparast A, Fatahi Z, Alamdary SZ, Reisi Z, Khodagholi F (2014) Changes in the levels of p-ERK, p-CREB, and c-fos in rat mesocorticolimbic dopaminergic system after morphine-induced conditioned place preference: the role of acute and subchronic stress. *Cell Mol Neurobiol.* 34(2):277-88.
- Hall FS, Drgonova J, Goeb M, Uhl GR (2003) Reduced behavioral effects of cocaine in heterozygous brain-derived neurotrophic factor (BDNF) knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 28:1485–1490
- Harlan RE, Shivers BD, Romano GJ, Howells RD, Pfaff DW (1987) Localization of preproenkephalin mRNA in the rat brain and spinal cord by in situ hybridization. *J Comp Neurol.* 258 (2):159-84.
- Heidbreder C, Shoaib M, Shippenberg TS (1996) Differential role of delta-opioid receptors in the development and expression of behavioral sensitization to cocaine. *Eur J Pharmacol* 298:207–216.
- Heijna MH, M Padt, H Hogenboom, PS Portoghese AH Mulder ANM, Schoffelmeer (1990) Opioid receptor-mediated inhibition of dopamine and acetylcholine release from slices of rat nucleus accumbens, olfactory tubercle and frontal cortex, *Eur. J. Pharmacol.* 18 267-278.
- Henry DJ, White FJ (1991). Repeated cocaine administration causes persistent enhancement of D1 dopamine receptor sensitivity within the rat nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther.* 258(3):882-90.
- Hipólito L, Sánchez-Catalán MJ, Zanolini I, Polache A, Granero L (2008) Shell/core differences in mu- and delta-opioid receptor modulation of dopamine efflux in nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 55(2):183-9.
- Hirose N, Murakawa K, Takada K, Oi Y, Suzuki T, Nagase H, Cools a R, Koshikawa N (2005) Interactions among mu- and delta-opioid receptors, especially putative delta1- and delta2-opioid receptors, promote dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 135:213–225
- Holt D J, Graybiel A M, Saper C B (1997) Neurochemical architecture of the human striatum. *J. Comp. Neurol* 384: 1–25.
- HookV, Toneff T, Baylon S, Sei C (2008) Differential activation of enkephalin, galanin, somatostatin, NPY, and VIP neuropeptide production by stimulators of protein kinases A and C in neuroendocrine chromaffin cells. *Neuropeptides* 42(5-6):503-11.
- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ (1994) Induction of a long lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13:1235–1244.
- Horger BA, Iyasere CA, Berhow MT, Messer CJ, Nestler EJ, Taylor JR (1999) Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 19:4110–4122
- Huang CC, You JL, Wu MY, Hsu K (2004) Rap1-induced p38 mitogenactivated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI.Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long-term depression. *J Biol Chem* 279:12286 –12292.
- Huang YZ, Pan E, Xiong ZQ, McNamara JO. (2008). Zinc- mediated trans-activation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron* 57, 546–558.
- Huang YZ, McNamara JO (2010) Mutual regulation of src family kinases and the neurotrophin receptor TrkB. *J Biol Chem* 285:8207–8217.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature (Lond)* 258:577–580.
- Hummel M, Ansonoff M a, Pintar JE, Unterwald EM (2004) Genetic and pharmacological manipulation of mu opioid receptors in mice reveals a differential effect on behavioral sensitization to cocaine. *Neuroscience* 125:211–220
- Hummel M, Schroeder J, Liu-Chen L-Y, Cowan A, Unterwald EM (2006) An antisense oligodeoxynucleotide to the mu opioid receptor attenuates cocaine-induced behavioral sensitization and reward in mice. *Neuroscience* 142:481–491
- Hurd YL, Herkenham M (1992) Influence of a single injection of cocaine, amphetamine or GBR 12909 on mRNA expression of striatal neuropeptides. *Mol Brain Res* 16:97-104.

- Jean Bierut, L (2011) Genetic vulnerability and susceptibility to Substance dependence. *Neuron* 69 618-627
- Jeanneteau F, Garabedian M J, and Chao M V (2008) Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4862–4867.
- Jiang ZG, North R (1992) Pre- and postsynaptic inhibition by opioids in rat striatum. *J Neurosci* 12:356–361.
- Johnson SW, North RA, (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J. Neurosci.* 12, 483-488.
- Kahlig, KM, Galli, A (2003) Regulation of dopamine transporter function and plasma membrane expression by dopamine, amphetamine and cocaine. *European journal of Pharmacology* 479:153-158.
- Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S, Numa S (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine b-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature (Lond)* 298:245–249.
- Kalivas PW (1995). Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants *Drug Alcohol Depend.* 37, 95–100.
- Kalivas PW, Duffy P (1990a) Effect of acute and daily cocaine treatment of extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Synapse* 5(1):48-58.
- Kalivas PW, Duffy P (1990b) Effect of Acute and Daily Neurotensin and Enkephalin Extracellular Dopamine in the Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 10(9):2940–2949.
- Kalivas PW, Duffy P (1993) Time Course of Extracellular Dopamine and Behavioral Sensitization to Cocaine 1. Dopamine Axon Terminals. *J Neurosci* 13:266–275.
- Kalivas PW, Duffy P (1998) Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area. *J Neurochem* 70:1497–1502.
- Kalivas PW, Duffy P, Dilts R, Abhold R (1988) Enkephalin modulation of A10 dopamine neurons: a role in dopamine sensitization. *Ann N Y Acad Sci.*537:405-14.
- Kalivas PW, Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16:223–44.
- Kalivas PW, Widerlöv E, Stanley D, Breese G, Prange AJ Jr (1983) Enkephalin action on the mesolimbic system: a dopamine-dependent and a dopamine-independent increase in locomotor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 227:229–237.
- Kashihara K, Ishihara T, Akiyama K, Abe K (1999) D1/D2 receptor synergism on CREB DNA-binding activities in the caudate-putamen of rat. *Neurol. Res.* 21, 781–784.
- Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 66: 285–306.
- Kim HS, Park WK, Jang CG, Oh KW, Kong JY, Oh S, Rhee HM, Cho DH KS (1997) Blockade by naloxone of cocaine-induced hyperactivity, reverse tolerance and conditioned place preference in mice. *Behav Brain Res* 85:37–46.
- Kim S, Shin JK, Yoon HS KJ (2011) Blockade of ERK Phosphorylation in the Nucleus Accumbens Inhibits the Expression of Cocaine-induced Behavioral Sensitization in Rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 15:389–395.
- Kim M, Au E, Neve R, Yoon BJ. (2009) AMPA receptor trafficking in the dorsal striatum is critical for behavioral sensitization to cocaine in juvenile mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 379(1):65-9.
- Kohara K, Kitamura A, Morishima M, Tsumoto T (2001) Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons *Science.* 291(5512):2419-23.
- Konig M, Zimmer AM, Steiner H, Holmes PV CJ, Al. BM et (1996) Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature* 383:535–538.

- Koob GF, Caine B, Markou A, Pulvirenti L, Weiss, F (1994) Role of mesocortical dopamine system in the motivating effects of cocaine. *NIDA Research Monograph* 145:1-18.
- Koob GF (1992) Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 654:171-91
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*. 278(5335):52-8.
- Koob GF, Le Moal M (2008) Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol* 59:29-53.
- Koob,GF, Nestler EJ (1997) The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9(3):482-97
- Kourrich S, Rothwell PE, Klug JR, Thomas MJ (2007) Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 27:7921–7928.
- Krapivinsky G, Medina I, Krapivinsky L, Gapon S C DE (2004) SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron* 43:563–574.
- Kreek MJ, Bart G, Lilly C, LaForge KS, Nielsen DA (2005) Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments. *Pharmacol Rev* 57: 1–26.
- Latimer LG, Duffy P, Kalivas PW (1987) Mu opioid receptor involvement in enkephalin activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther*. 241(1):328-37.
- Law P, Wong YH, Loh HH (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 40 :389–430.
- Le Foll B , Diaz J (2005) A single cocaine exposure increases BDNF and D 3 receptor expression: implications for drug-conditioning. *Neuroreport* 16:175–178.
- Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL (2009) Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev* 89:1379–1412.
- Le Moal M, Simon H (1991) Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiological Reviews* 71(1):155-234.
- Lee FS, Chao MV (2001) Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3555–3560.
- Leri F, Zhou Y, Goddard B, Cummins E, Kreek MJ (2006). Effects of high-dose methadone maintenance on cocaine place conditioning, cocaine self-administration, and mu-opioid receptor mRNA expression in the rat brain. *Neuropsychopharmacology* 31:1462–1474.
- Lesscher HM, Hordijk M, Bondar NP, Alekseyenko OV, Burbach JP, van Ree JM et al. (2005) Mu-opioid receptors are not involved in acute cocaine-induced locomotor activity nor in development of cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology* 30: 278-285.
- Lessman V. (1998). Neurotrophin- dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *Gen. Pharmacol.* 31, 667–674.
- Li X, Wolf ME (2011) Brain-derived neurotrophic factor rapidly increases AMPA receptor surface expression in rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 34:190–198
- Li Y, Vartanian A J, White F J, Xue C J, Wolf ME (1997) Effects of the AMPA receptor antagonist NBQX on the development and expression of behavioral sensitization to cocaine and amphetamine. *Psychopharmacology* 134, 266–276.
- Licata SC, Pierce RC (2003) The roles of calcium/calmodulin-dependent and Ras/mitogen-activated protein kinases in the development of psychostimulant-induced behavioral sensitization. *J Neurochem*. 85(1):14-22.
- Lindberg I, Shaw E, Finley J, Leone D, Deininger P (1991) Posttranslational modifications of rat proenkephalin overexpressed in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 128:1849-1856

- Lissin DV, Carroll RC, Nicoll RA, Malenka RC, von Zastrow M (1999) Rapid, activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 19 (4):1263-72.
- Liste I, Rodríguez-Pallares J, Caruncho HJ, Labandeira-Garcia JL (1999) Locomotor activity- induced changes in striatal levels of preprotachykinin and preproenkephalin mRNA: regulation by the dopaminergic and glutamatergic systems. *Mol Brain Res* 70:74–83.
- Lobo MK, Covington HE, Chaudhury D, Friedman AK, Sun H, Damez-Werno D, Dietz D, Zaman S, Koo JW, Kennedy PJ, Mouzon E, Mogri M, Neve RL, Deisseroth K, Han M, Nestler EJ (2010) Cell Type Specific Loss of BDNF Signaling Mimics Optogenetic Control of Cocaine Reward. *Science* 330(6002):385–390.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature (Lond)* 267:495–499.
- Lu L, Koya E, Zhai H, Hope BT, Shaham Y (2006) Role of ERK in cocaine addiction. *Trends Neurosci* 29:695–703
- Lucas LR, Harlan RE (1995) Cholinergic regulation of tachykinin- and enkephalin gene expression in the rat striatum. *Mol Brain Res* 30: 181–95.
- Magendzo K, Bustos G (2003) Expression of amphetamine-induced behavioral sensitization after short- and long-term withdrawal periods: participation of mu- and delta-opioid receptors. *Neuropsychopharmacology* 28:468–477
- Malinow R (2003) AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philos.Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 358, 707–714.
- Mangiavacchi S, Wolf ME (2004) Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors, AMPA receptors or metabotropic glutamate receptors leads to rapid internalization of AMPA receptors in cultured nucleus accumbens neurons. *Eur J Neurosci.* 20(3):649-57.
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. (1995a) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18: 22-29
- Mansour A, Hoversten MT, Taylor LP, Watson SJ, Akil H (1995b) The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Res* 700: 89-98.
- Mao L, Wang JQ (2003) Contribution of ionotropic glutamate receptors to acute amphetamine-stimulated preproenkephalin mRNA expression in the rat striatum in vivo. *Neurosci Lett* 2003;346:17–20.
- Marin MT, Berkow A, Golden SA, Koya E, Cleopatra S, Hope BT (2009) Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 30:1931–1940.
- Markou A, Weiss F, Gold LH, Caine SB, Schulteis G, Koob GF (1993) Animal models of drug craving. *Psychopharmacology (Berl)* 112(2-3):163-82.
- Martin G, Nie Z, Siggins G R (1997) Mu-Opioid receptors modulate NMDA receptor-mediated responses in nucleus accumbens neurons. *J Neurosci* 17(1):11-22.
- Martin WR (1983) Pharmacology of opioids. *Pharmacol Rev.* 35(4):283-323.
- Mathieu-Kia a M, Besson MJ (1998) Repeated administration of cocaine, nicotine and ethanol: effects on preprodynorphin, preprotachykinin A and preproenkephalin mRNA expression in the dorsal and the ventral striatum of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 54:141–151
- Mathon DS, Lesscher HM, Gerrits MA, Kamala A, Pintar JE, et al (2005) Increased gabaergic input to ventral tegmental area dopaminergic neurons associated with decreased cocaine reinforcement in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuroscience* 130(2):359-67.
- Mattson BJ, Bossert JM, Simmons DE, Nozaki N, Nagarkar D, Kreuter JD, Hope BT (2005) Cocaine-induced CREB phosphorylation in nucleus accumbens of cocaine-sensitized rats is enabled by enhanced activation of extracellular signal-related kinase, but not protein kinase A. *J Neurochem* 95:1481–1494

- Mazzucchelli C, Vantaggio C, et al.(2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34:807– 820.
- McCollum LA, Roche JK, Roberts RC (2012) Immunohistochemical localization of enkephalin in the human striatum: a postmortem ultrastructural study. *Synapse* 66(3):204-19
- McGinty J, Whitfield, TW, Berglind WJ (2010) Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain Res* 1314:183–193.
- McGinty JF, Bache AJ, Coleman NT, Sun W-L (2011) The Role of BDNF/TrkB Signaling in Acute Amphetamine-Induced Locomotor Activity and Opioid Peptide Gene Expression in the Rat Dorsal Striatum. *Front Syst Neurosci* 5:60
- Meilandt WJ, Yu G-Q, Chin J, Roberson ED, Palop JJ, Wu T, Scearce-Levie K, Mucke L (2008) Enkephalin elevations contribute to neuronal and behavioral impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28:5007–5017
- Menkens K, Bilsky EJ, Wild KD, Portoghese PS, Reid LD, Porreca F (1992) Cocaine place preference is blocked by the delta-opioid receptor antagonist, naltrindole. *Eur J Pharmacol* 219: 345–346.
- Miserendino MJ, Nestler EJ (1995) Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. *Brain Res* 674:299–306.
- Monnier D, Loeffler JP (1998) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates proenkephalin gene transcription through AP1- and CREB-dependent mechanisms. *DNA Cell Biol* 17.:151–159.
- Mooney LJ, Nielsen S, Saxon A, Hillhouse M, Thomas C, Hasson A, Stablein D, McCormack J, Lindblad R LW (2013) Cocaine use reduction with buprenorphine (CURB): rationale, design, and methodology. *Contemp Clin Trials* 34:196–204.
- Moratalla R, Elibol B, Vallejo M, Gaybriel AM (1996) Network-level changes in expression of inducible fos-jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. *Neuron* 17:147–156.
- McClung CA, Nestler EJ (2008) Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology* 33(1):3-17
- Mulder, G. Wardeh, F. Hogenboom ALF (1984) Kappa and delta-opioid agonists differentially inhibit striatal dopamine and acetylcholine release. *Nature* 308 :278–280.
- Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-b-lipotropin precursor. *Nature (Lond)* 278:423–427.
- Nestler EJ (1997) Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Curr Opin Neurobiol* 7:713–719.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2(2):119-28.
- Nestler EJ (2004) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* 25(4):210-8.
- Nestler EJ (2008) Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 363(1507):3245-55
- Nestler EJ, Aghajanian GK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278(5335):58-63
- Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL (1993) Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 11:995–1006.
- Nikoshkov A, Drakenberg K, Wang X, Horvath MC, Keller E, Hurd YL (2008) Opioid neuropeptide genotypes in relation to heroin abuse: dopamine tone contributes to reversed mesolimbic proenkephalin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(2):786-91.
- Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S, Numa S (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature (Lond)* 295:202–206.

- Pacchioni AM, Cador M, Bregonzio C, Cancela LM (2007) A glutamate- dopamine interaction in the persistent enhanced response to amphetamine in nucleus accumbens core but not shell following a single restraint stress. *Neuropsychopharmacol* 32:682–692.
- Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev* 20: 91–127.
- Piazza PV, Deminière JM, Le Moal M, Simon H (1989) Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science*. 245(4925):1511-3.
- Pierce RC, Bell K, Duffy P, Kalivas PW (1996) Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J Neurosci* 16:1550–1560.
- Pierce RC, Kalivas PW (1997a) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 25(2):192-216.
- Pierce RC, Kalivas, PW (1997b) Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. *Journal of Neuroscience* 17(9):3254-3261.
- Pierce RC, Pierce-Bancroft AF, Prasad BM (1999) Neurotrophin-3 contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine by activating the Ras/Mitogen-activated protein kinase signal transduction cascade. *J Neurosci* 19:8685–8695
- Poo MN (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*. 2(1):24-32
- Przewlocka B, Lason W (1995) Adaptive changes in the proenkephalin and D2 dopamine receptor mRNA expression after chronic cocaine in the nucleus accumbens and striatum of the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 5:465–469.
- Pu L, Liu Q, Poo M (2006) BDNF-dependent synaptic sensitization in midbrain dopamine neurons after cocaine withdrawal. *Nat Neurosci* 9:605–607
- Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS CM (2004) Transactivation of trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J Neurosci* 24:6650–6658.
- Rantamäki T, Vesa L, Antila H, Di Lieto A, Tammela P, Schmitt A, Lesch K-P, Rios M, Castrén E (2011) Antidepressant drugs transactivate TrkB neurotrophin receptors in the adult rodent brain independently of BDNF and monoamine transporter blockade. *PLoS One* 6:e20567
- Rawls SM, McGinty JF (2000) Delta opioid receptors regulate calcium-dependent, amphetamine-evoked glutamate levels in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 861:296–304.
- Reid MS, Berger SP (1996) Evidence for sensitization of cocaine-induced nucleus accumbens glutamate release. *Neuroreport* 7:1325–1329.
- Robinson TE, Berridge K (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18:247–291.
- Robinson TE, Berridge KC (2001) Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 96:103–114.
- Robison AJ, Nestler EJ (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* 12:623–637
- Roy BP, Jamal I, Go J (1982) Synaptic mechanism of methionine-enkephalin uptake. *Life Sci* 31(20-21):2307-10.
- Russo SJ, Mazei-Robison MS, Ables JL, Nestler EJ (2009) Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology*. 56 Suppl 1:73-82
- Sabol SL, Liang CM, Dandekar S, Kranzler LS (1983) In vitro biosynthesis and processing of immunologically identified methionine-enkephalin precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* 258:2697-2704.

- Sala M, Braida D, Colombo M, Groppetti A, Sacco S, Gori E PM (1995) Behavioral and biochemical evidence of opioidergic involvement in cocaine sensitization. *J Pharmacol Exp Ther* 274:450–7.
- Salvatore MF, Apparsundaram S, Gerhardt GA (2003) Decreased plasma membrane expression of striatal dopamine transporter in aging. *Neurobiol Aging*. 24(8):1147-54.
- Schmitz JM, Lindsay JA, Green CE, Herin DV, Stotts AL MF (2009) High-dose naltrexone therapy for cocaine-alcohol dependence. *Am J Addict* 18:356–62.
- Schroeder JA, Hummel M, Simpson AD, Sheikh R SA, Unterwald EM (2007) A role for mu opioid receptors in cocaine-induced activity, sensitization, and reward in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 195:265–272.
- Schumann J, Yaka R (2009) Prolonged withdrawal from repeated noncontingent cocaine exposure increases NMDA receptor expression and ERK activity in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 29:6955–6963
- Schuman EM (1999) Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* 9(1):105-9
- Schuster CR, Thompson T (1969) Self administration of and behavioral dependence on drugs. *Annu Rev Pharmacol* 9: 483–502.
- Seidah NG, Prat A (2002) Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem* 38:79-94.
- Seroogy KB, Lundgren KH, Tran TM, Guthrie KM, Isackson PJ, Gall CM (1994) Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *J Comp Neurol* 342:321–334.
- Sesack SR, Pickel VM (1992) Dual ultrastructural localization of enkephalin and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the rat ventral tegmental area: multiple substrates for opiate-dopamine interactions. *J. Neurosci.* 12, 1335-1350.
- Sesack SR, Pickel VM (1995) Ultrastructural relationships between terminals immunoreactive for enkephalin, GABA, or both neurotransmitters in the rat ventral tegmental area. *Brain Res.* 672, 261-275.
- Sgambato V, Pages C, Rogard M, Besson MJ, Caboche J (1998) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation. *J Neurosci* 18:8814–8825.
- Shi XD, McGinty JF (2007) Repeated amphetamine treatment increases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase, protein kinase B, and cyclase response element binding protein in the rat striatum. *J. Neurochem.* 103, 706–713.
- Shi X, McGinty JF. (2006) Extracellular signal-regulated mitogenactivated protein kinase inhibitors decrease amphetamine-induced behavior and neuropeptide gene expression in the striatum. *Neuroscience* 138, 1289–1298.
- Shippenberg TS, Chefer VI (2003) Opioid modulation of psychomotor stimulant effect. In: Maldonado R (ed.). *Molecular Biology of Drug Addiction*. Humana Press Inc: Totowa, NJ, pp.107-132
- Shippenberg TS, Elmer GI (1998) The neurobiology of opiate reinforcement. *Crit Rev Neurobiol* 12: 267–303.
- Shippenberg TS, Heidbreder C (1995) The delta opioid receptor antagonist naltridole prevents sensitization to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Eur J Pharmacol* 280(1):55–61.
- Shoblock JR, Maidment NT (2007) Enkephalin release promotes homeostatic increases in constitutively active mu opioid receptors during morphine withdrawal. *Neuroscience* 149:642–649
- Simmons D, Self DW (2009). Role of mu- and delta-opioid receptors in the nucleus accumbens in cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology*. 34(8):1946-57.
- Smart D, Lambert DG (1996) Delta-Opioids stimulate inositol 1,4,5-trisphosphate formation, and so mobilize Ca²⁺ from intracellular stores, in undifferentiated NG108-15 cells. *J Neurochem.* 66(4):1462-7.
- Smith AJW, McGinty JF (1994) Acute amphetamine and methamphetamine alter opioid peptide mRNA expression in the rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 21:359–362.

- Smith M, Cole KT, Iordanou JC, Kerns DC, Newsom PC, Peitz GW, Schmidt KT (2013) The mu/kappa agonist nalbuphine attenuates sensitization to the behavioral effects of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 104:40–46
- Soderman AR, Unterwald EM (2008) Cocaine reward and hyperactivity in the rat: sites of mu opioid receptor modulation. *Neuroscience* 154(4):1506-16.
- Soderman AR, Unterwald EM (2009) Cocaine-induced mu opioid receptor occupancy within the striatum is mediated by dopamine D2 receptors. *Brain Res* 1296: 63–71.
- Sorg BA, Davidson DL, Kalivas PW, Prasad BM (1997) Repeated daily cocaine alters subsequent cocaine-induced increase of extracellular dopamine in the medial prefrontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 281:54–61.
- Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS (1990) The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 55:1734-40.
- Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS (1992) Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(6):2046-50.
- Spangler R, Zhou Y, Maggoc, Schlussman S, Ho A, Kreek MJ (1997) Prodynorphin, proenkephalin and kappa opioid receptor mRNA responses to acute “binge” cocaine, *Mol. Brain Res.* 44 139–142.
- Steiner H, Gerfen C (1993) Cocaine-induced c-Fos messenger RNA is inversely related to dynorphin expression in striatum. *J Neurosci* 13:5066–5081.
- Stewart J, Druhan J P (1993) The development of both conditioning and sensitization of the behavioral activating effects of amphetamine is blocked by the noncompetitive NMDA receptor antagonist, MK-801. *Psychopharmacology* 110, 125–132.
- Suto N, Tanabe LM, Austin JD, Creekmore E, Pham CT, Vezina P (2004) Previous exposure to psychostimulants enhances the reinstatement of cocaine seeking by nucleus accumbens AMPA. *Neuropsychopharmacol*, 29:2149–2159.
- Svingos AL, Clarke CL, Pickel VM (1998) Cellular sites for activation of delta-opioid receptors in the rat nucleus accumbens shell: relationship with Met-enkephalin. *J Neurosci.* 18(5):1923-33.
- Svingos AL, Moriwaki A, Wang JB, Uhl GR, Pickel VM (1996) Ultrastructural immunocytochemical localization of mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens: extrasynaptic plasmalemmal distribution and association with Leu5-enkephalin. *J Neurosci* 16: 4162–4173.
- Svingos AL, Moriwaki A, Wang JB, Uhl GR, Pickel VM. (1997) Mu-Opioid receptors are localized to extrasynaptic plasma membranes of GABAergic neurons and their targets in the rat nucleus accumbens. *J Neurosci.* 17(7):2585-94
- Swerdlow NR, Vaccarino FJ, Amalric M, Koob GF (1986) The neural substrates for the motor activating properties of psychostimulants: a review of recent findings. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 25(1):233-48.
- Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Sevarino KA, Crain SM, Nestler EJ (1991) A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Res.*10; 548(1-2):100-10.
- Thompson AC, Zapata A, Justice Jr JB, Vaughan RA, Sharpe LG, Shippenberg TS (2000) Kappa-opioid receptor activation modifies dopamine uptake in the nucleus accumbens and opposes the effects of cocaine. *J Neurosci* 20:9333-40.
- Trigo JM, Martín-García E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R (2010) The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. *Drug Alcohol Depend* 108(3):183-94
- Unterwald EM, Kreek MJ, Cuntapay M (2001) The frequency of cocaine administration impacts cocaine-induced receptor alterations. *Brain Res* 900: 103–109.
- Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2000) Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* 20:8701–8709.

- Valjent E, Corvol JC, Trzaskos JM, Girault JA, Hervé D (2006) Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci* 7:20
- Valjent E, Pagès C, Hervé D, Girault JA, Caboche J (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci*. 19(7):1826-36.
- Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol J-C, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Hervé D, Girault J-A (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:491–496
- Van der Kooy D (1987). Place conditioning: a simple and effective method for assessing the motivational properties of drugs. In: Bozarth MA (ed). *Methods of Assessing the Reinforcing Properties of Abused Drugs*. Springer-Verlag: New York. pp 229–240.
- Van Ree JM, De Wied D, Bradbury AF, Hulme EC, Smyth DC, Snell CR (1976) Induction of tolerance to the analgesic action of lipotropin C-fragment. *Nature (Lond)* 264:792–794.
- Van Ree JM, Niesink RJ, Van Wolfswinkel L, Ramsey NF, Kornet MM, Van Furth WR et al (2000) Endogenous opioids and reward *Eur J Pharmacol* 405: 89–101.
- Vanderschuren LJ, Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 151:99–120.
- Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pages C, Besson MJ, Hipskind RA, Caboche J (1999) Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol* 19:136–146.
- Vialou V, Jian Feng, Alfred J Robison, Stacy M. Ku, Deveroux Ferguson, Kimberly N. Scobie, Michelle S. Mazei-Robison, Ezekiel Mouzon, and Eric J. Nestler (2012) Serum Response Factor and cAMP Response Element Binding Protein Are Both Required for Cocaine Induction of FosB *J Neurosci*, 32(22):7577-7584
- Vink J.M., Willemsen G, Boomsma DI. (2005). Heritability of smoking initiation and nicotine dependence. *Behav. Genet.* 35, 397–406.
- Voorn P, Brady LS, Berendse HW, Richfield EK (1996) Densitometrical analysis of opioid receptor ligand binding in the human striatum-I. Distribution of mu opioid receptor defines shell and core of the ventral striatum. *Neuroscience* 75(3):777-92.
- Wang JQ, McGinty JF (1995) Alterations in striatal zif/268, prodynorphin and preproenkephalin mRNA expression induced by repeated amphetamine administration in rats. *Brain Res* 673:262–74.
- Wang JQ, McGinty JF (1996) D1 and D2 receptor regulation of proenkephalin and prodynorphin mRNA in rat striatum following acute injection of amphetamine or methamphetamine. *Synapse* 22:114–22.
- Wang JQ, McGinty JF (1997) The full D1 dopamine receptor agonist SKF-82958 induces neuropeptide mRNA in the normonsensitive striatum of rats: regulation of D1/D2 interactions by muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 281:972–81.
- White FJ, Kalivas PW (1998) Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction *Drug Alcohol Depend* 51(1-2):141-53
- Williams JM, Stekete JD (2004) Cocaine increases medial prefrontal cortical glutamate overflow in cocaine-sensitized rats: a time course study. *Eur J Neurosci* 20:1639–1646.
- Wolf M E, Jeziorski M (1993) Coadministration of MK-801 with amphetamine, cocaine or morphine prevents rather than transiently masks the development of behavioral sensitization. *Brain Res.* 613, 291–294.
- Wolf ME (1998) The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* 54:679–720

- Wolf ME, Xue CJ (1998) Amphetamine and D1 dopamine receptor agonists produce biphasic effects on glutamate efflux in rat ventral tegmental area: modification by repeated amphetamine administration. *J Neurochem* 70:198–209.
- Wolf, M E (2002) Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. *Molecular Intervention* 2(3):249-255.
- Woolverton WL, Johnson KM (1992) Neurobiology of cocaine abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13:193–200.
- Xi ZX, Ramamoorthy S, Baker DA, Shen H, Samuvel DJ, Kalivas PW (2002) Modulation of group II metabotropic glutamate receptor signaling by chronic cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 303:608–615.
- Xia Y, Portugal GS, Fakira AK, Melyan Z, Neve R, Lee HT, Russo SJ, Liu J, Morón JA.(2011) Hippocampal GluA1-containing AMPA receptors mediate context-dependent sensitization to morphine *J Neurosci*. 31(45):16279-91.
- Yasothornsrikul S, Greenbaum D, Medzihradzky KF, Toneff T, Bunday R, Miller R, Schilling B, Petermann I, Dehnert J, Logvinova A, Goldsmith P, Neveu JM, Lane WS, Gibson B, Reinheckel T, Peters C, Bogyo M, Hook V (2003) Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(16):9590-5.
- Yasothornsrikul S, Toneff T, Hwang SR, Hook VY (1998) Arginine and lysine aminopeptidase activities in chromaffin granules of bovine adrenal medulla: relevance to prohormone processing. *J Neurochem* 70(1):153-63.
- Yoshida Y, Koide S, Hirose N, Takada K, Tomiyama K, Koshikawa N, Cools AR (1999) Fentanyl increases dopamine release in rat nucleus accumbens: involvement of mesolimbic mu- and delta-2- opioid receptors. *Neuroscience* 92:1357–1365.
- Yoo JH, Kitchen I, Bailey A (2012) The endogenous opioid system in cocaine addiction: what lessons have opioid peptide and receptor knockout mice taught us? *Br J Pharmacol* 166:1993–2014
- Yuferov V, Levran O, Proudnikov D, Nielsen DA, Kreek MJ (2010) Search for genetic markers and functional variants involved in the development of opiate and cocaine addiction and treatment. *Ann N Y Acad Sci* 1187: 184–207.
- Zhai H LY, LL (2008) Drug-induced alterations in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway: implications for reinforcement and reinstatement. *Cell Mol Neurobiol* 28(2):157-72
- Zhang XF, Hu XT, White FJ, Wolf ME (1997) Increased responsiveness of ventral tegmental area dopamine neurons to glutamate after repeated administration of cocaine or amphetamine is transient and selectively involves AMPA receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 281:699–706.
- Zhang D, Zhang L, Lou DW, Nakabeppu Y, Zhang J XM (2002) The dopamine D1 receptor is a critical mediator for cocaine-induced gene expression. *J Neurochem* 82:1453–1464.
- Zhang L, Lou D, Jiao H, Zhang D, Wang X, Xia Y, Zhang J, XuM (2004) Cocaine-induced intracellular signaling and gene expression are oppositely regulated by the dopamine D1 and D3 receptors. *J. Neurosci*. 24, 3344–3354.
- Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, van Aiest L MR (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110:443– 455.
- Zhu Y, Pak D, Qin Y, McCormack SG, Kim MJ, Baumgart JP V V, Auberson YP, Osten P, van Aeslst L, Sheng M ZJ (2005) Rap2-JNK removes synaptic AMPA receptors during depotentiation. *Neuron* 46:905–916.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Mongi-Bragato B, Zamponi E, García-Keller C, Assis MA, Virgolini MB, Mascó DH, Zimmer A, Cancela LM. “Enkephalin is essential for the molecular and behavioral expression of cocaine sensitization” En prensa *Addiction Biology* (2014). doi:10.1111/adb.12200

Assis MA, Mongi Bragato B, Renna MS, Sotomayor C, Cancela LM. Cocaine induced increase in met-enkephalin and proenkephalin mRNA levels in mesocorticolimbic brain areas is reversed by MK-801: an influence on the lymphoproliferative response. Enviado (2014).

Mongi Bragato B, Assis MA, Cancela LM. “Role of the enkephalinergic system in the central and immune effects of psychostimulants”. (2014) Revisión en preparación