

Este trabajo está bajo licencia [CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)© 2 por Gabach, Laura Alejandra



UNC

Universidad
Nacional
de Córdoba



FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas



EL OXIDO NÍTRICO COMO INTERMEDIARIO EN LAS NEUROADAPTACIONES QUE SUBYACEN A LA SENSIBILIZACIÓN A COCAÍNA

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Bióloga Laura Alejandra Gabach

**IFEC-CONICET
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
ARGENTINA
Diciembre 2014**

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUÍMICAS

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS

Signatura R-1

Topogr. lina. 615.78

..... G

N.º inventari. 12632

Agente

Donación

Previo

Exemplar Donación del Auto

Ord. de Ejecución


Libro

Página

Fecha de ingreso. 15-4-2015

			
--	--	--	--

COMISIÓN DE TESIS


DIRECTOR: Dra. Mariela Pérez

MIEMBROS:


Dra. Claudia Bregonzio


Dra. Virginia Rivero


Dr. Carlos Arce

EVALUADOR EXTERNO: Dra. Alicia Brusco

El presente trabajo de tesis ha sido realizado en el Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC-CONICET), Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo a la reglamentación vigente para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Para la realización de este trabajo la autora contó con una beca del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) 2010-2015, además del apoyo financiero de subsidios otorgados por CONICET, Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT), Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC) y Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba (MINCyT).

Se deja constancia que se ha cumplimentado con los cursos requeridos, así como también se realizaron actividades docentes en asignaturas del Departamento de Farmacología de esta Facultad, contando para ello con un cargo de Profesor Asistente (dedicación simple) obtenido por concurso.

“Si supiese qué es lo que estoy haciendo, no le llamaría investigación, verdad?”

Albert Einstein

A mis padres

A mi hermana

A mis abuelos

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS

Agradecimientos

Quisiera expresar mis agradecimientos a todos aquellos que hicieron posible la realización de esta tesis...

Al Departamento de Farmacología y sus profesores, y esta Facultad, por permitirme seguir creciendo en mi formación académica, como también al CONICET por el apoyo económico.

A mi comisión de Tesis, por sus ideas, contribuciones y por las discusiones generadas para aportar a este trabajo. Al evaluador externo, por su tiempo y por aceptar ser evaluador de esta tesis.

A Mariela... que supo incentivar me en el camino de la ciencia, por creer en mí, por sus palabras de aliento y por hacerme sentir el valor de mis opiniones, por sus correcciones siempre constructivas que me ayudaron a aprender y mejorar cada día, por hacer que estos años de ciencia sean vividos no solo como trabajo y estudio sino también como gratos momentos compartidos, pero por sobre todas las cosas por su calidez humana..

A Lorena y a Estela, por la predisposición, la infinita paciencia y valiosa contribución en las tareas prácticas. A Valeria por su colaboración y horas dedicadas a ayudarme en mis experimentos.

A Yani, Nico y Javi, porque su trabajo de cada día contribuyó a cada parte de esta tesis y su buen humor a entretener mis momentos en el bioterio.

A los secres, María José, Silvia y Pedro, por su trabajo de cada día en aporte a mi tesis y mis tareas docentes.

A Emilce, mi hermanita científica.. Gracias por divertirme cada día con tus locuras, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por aguantar mis días grises y no tanto, por estar siempre que te necesité!! Gracias porque encontré en vos la hermana menor que nunca tuve!

A mis amigos y compañeros del laboratorio. Por cada día compartido, por hacer que, a pesar de las dificultades de hacer ciencia, cada día tenga un tinte divertido y alegre, pero también por los momentos de diversión post-laborales, juntadas, días de paseo en el río, cumpleaños y fiestas varias. De cada uno aprendí algo y me llevo un pedacito, los voy a extrañar!

A mis compañeras de viajes, laborales y de vacaciones!! Marisa, Flor, Ale, Pato, Vane, Iva y Lauri. Gracias por los hermosos momentos y experiencias vividas juntas!

A los chicos western... Noe, Vane, Pablo, Iva y Pato, por sus consejos y aportes tan valiosos con mis aprendizajes para hacer western blot, por atender mis dudas con tanta paciencia, mil gracias!!

A Caro M y Lau M, por integrarme en el lab desde el momento en que llegué, por enseñarme los eternos LTP y por darme un lugarcito incluso del otro lado del mundo!. A Mercedes, por su paso fugaz por el lab, pero lleno de alegría y ganas contagiosas.

A mis compañeras de Facultad, Lau C, Mery, Mara, Caro, Vicky, Flor, Ine, Cyn y Lau F, con algunas compartimos el gusto por la ciencia, con otras las charlas de catarsis laboral y no tanto. Gracias a todas porque a pesar de las distancias siempre están presentes!

A mis amigas de la vida... Jesi, Inés y Marce. Mis hermanas del corazón! Porque con cada una de ustedes crecí y viví hermosos momentos, que guardo como los mejores recuerdos del tiempo que pasamos juntas. A Naty, por recibirme y hacerse siempre un tiempito para vernos y ponernos al día cada vez que viajo.

A mis abuelos, los dos ángeles mas lindos que me cuidan desde el cielo...

A mis nonos, mi debilidad... por enseñarme la importancia de cada momento vivido.

A Matías, por su cariño puro e incondicional, por acompañarme con tu paciencia y tus palabras dulces, por construir juntos nuestro futuro.

A mi hermana Marina, mi compañera desde mi primer día en el mundo. Gracias por creer siempre en mí, por ser mi apoyo y alentarme en cada decisión, por estar incondicionalmente compartiendo cada día, aún a la distancia, por ser no solo mi hermana sino mi mejor amiga.

A mis padres, a quienes les debo no solo mi vida sino todo lo que soy... Papá: gracias por darme siempre la libertad de elegir y apoyarme en cada decisión, por enseñarme a que siempre se puede, por darme al mismo tiempo lo que considero mi mejor virtud y mi peor defecto, la disciplina... Mamá: gracias por estar siempre para mí, por tu calidez y tu bondad infinita, por enseñarme el valor de los buenos gestos, por tu sensibilidad y por tu cariño que me abraza aún cuando estamos lejos...

Gracias infinitas...!!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
VULNERABILIDAD AL ABUSO DE DROGAS.....	8
ADOLESCENCIA: PERÍODO CRÍTICO EN EL DESARROLLO DE LA ADICCIÓN	9
CIRCUITO DE RECOMPENSA	10
EL HIPOCAMPO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MEMORIA Y LA ADICCIÓN	12
PLASTICIDAD SINÁPTICA: POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO	14
COCAINA.....	16
MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA ADICCIÓN: La Sensibilización Comportamental.....	18
OXIDO NITRICO	22
EL OXIDO NITRICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	25
ROL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA SENSIBILIZACIÓN Y LA ADICCIÓN	28
VIA DE SEÑALIZACIÓN NOS ₁ /NO/GCs/GMPc.....	29
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS. GENERALIDADES	36
1. Sujeto experimental	36
2. Drogas.....	36
3. Test comportamental: Actividad Locomotora	36
4. Diseño experimental	37
5. Electrofisiología.....	38
6. Test de evitación inhibitoria (step down).....	40

7. Neuroquímica	41
a. Actividad de la enzima NOS	41
b. Inmunohistoquímica de NOSn	42
c. Expresión de NOSn por Western Blot	43
8. Análisis Estadístico	45
RESULTADOS	46
1. Impacto de diferentes potenciadores o inhibidores de la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc en el desarrollo de sensibilización conductual a cocaína.	47
2. Participación de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc en la transmisión sináptica en el hipocampo, durante la sensibilización a cocaína, y su contribución al proceso patológico de aprendizaje asociado a la adicción.	55
2.1. Efecto de diferentes potenciadores o inhibidores de la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc en la transmisión sináptica en el hipocampo.	57
2.2. Impacto de una única administración de los diferentes potenciadores o inhibidores de la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc en la transmisión sináptica en el hipocampo.....	61
2.3. Efecto de la administración crónica de cocaína sobre la retención de la memoria.....	62
3. Cambios en la expresión y funcionalidad de la enzima NOS en el hipocampo asociados a la sensibilización a cocaína.	64
3.1. Actividad de NOS en la sensibilización a cocaína	65
3.2. Número de células positivas NOSn en hipocampo	67
3.3. Expresión de NOSn en hipocampo	68
4. Participación de la señalización por óxido nítrico en la <i>expresión</i> de la sensibilización conductual a cocaína y en la transmisión sináptica hipocampal asociada.....	71
4.1. Efecto de la inhibición de NOSn en la expresión de la sensibilización conductual	72
4.2. Impacto de la inhibición de NOSn en la plasticidad sináptica en el hipocampo.....	73
DISCUSIÓN	76

EL OXIDO NÍTRICO COMO INTERMEDIARIO EN LA PLASTICIDAD SINAPTICA Y LA SENSIBILIZACIÓN A COCAÍNA.....	77
IMPLICANCIA DE LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE NOS _n EN LA SENSIBILIZACIÓN A COCAÍNA.....	81
RELEVANCIA DE LA VÍA NOS _n /NO/GCs/GMPc EN LA VULNERABILIDAD A LA ADICCIÓN	83
BIBLIOGRAFÍA.....	86
PUBLICACIONES	

ABREVIATURAS

AMPc: *-del inglés- cyclic adenosine monophosphate:* Adenosin monofosfato cíclico

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol

CaMKII: Ca^{2+} /calmodulina quinasa

COC: cocaína

fEPSPs: *-del inglés- field Excitatory Post-Synaptic Potentials:* Potenciales Post-Sinápticos
Excitatorios de campo

GCs: guanilato ciclasa soluble

GMPc: *-del inglés- cyclic guanosine monophosphate:* Guanosin monofosfato cíclico.

LTP: *-del inglés- Long Term Potentiation:* Potenciación a Largo Plazo

NAc: núcleo accumbens

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NMDA: N-methyl-d-Aspartate

NO: *-del inglés- nitric oxide:* óxido nítrico

NOS: *-del inglés- nitric oxide synthase:* Oxido nítrico sintaza

ODQ: 1H-[1,2,4]-oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one

PDE₅: *-del inglés- phosphodiesterase 5:* Fosfodiesterasa 5

PP: *-del inglés- perforant pathway:* Tracto perforante

SAL: salina

SIL: sildenafil

SNK: Student-Newman-Keuls

VEH: vehículo

VTA: *-del inglés- ventral tegmental area:* Área tegmental ventral

7-NI: 7-nitroindazole

RESUMEN

La cocaína es una de las drogas de abuso más utilizadas y la adicción a drogas una de las patologías más difíciles de tratar. A pesar de los numerosos esfuerzos para desarrollar tratamientos eficaces que eviten la recaída a las drogas de abuso, la falta de los mismos radica en el conocimiento relativamente incompleto acerca de los procesos neurobiológicos que subyacen a estos fenómenos. La sensibilización se refiere a cambios duraderos en determinadas conductas que subyacen a los fenómenos de compulsión y recaída al uso de diferentes drogas de abuso, una vez instaurada la adicción. Si bien muchos protocolos de administración repetida de cocaína han probado desarrollar sensibilización, este fenómeno ocurre solo en una proporción de los animales expuestos al psicofármaco. El óxido nítrico es un neurotransmisor gaseoso que está implicado en la adquisición y el mantenimiento de los efectos conductuales de la cocaína. Por otra parte, ha sido reportada la utilización de inhibidores de PDE₅, como sildenafil, que inhiben la hidrólisis de GMPc, en combinación con drogas ilícitas como la cocaína en humanos. En este estudio investigamos la contribución de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc tanto en el *desarrollo* como en la *expresión* de la sensibilización a cocaína, y su importancia en el proceso patológico de aprendizaje que está asociado a la adicción, a través de la evaluación de los cambios plásticos que ocurren en el hipocampo. Demostramos que, la administración repetida de cocaína induce sensibilización comportamental en el 50% de los animales tratados y ésta se correlaciona con un incremento en la plasticidad sináptica hipocampal. También observamos un aumento en la actividad de la enzima NOS y en los niveles de proteína NOSn en dicha estructura, solo en el grupo de animales sensibilizados. En base a los resultados de esta investigación la activación de la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc podría ser considerada como uno de los mecanismos por el que NO participa tanto en el desarrollo como en la expresión de la sensibilización y en el fenómeno plástico observado en el hipocampo luego de la administración repetida de cocaína. Así, podemos especular que la regulación positiva de la vía mencionada en diferentes áreas del cerebro, podría iniciar, contribuir o exacerbar los comportamientos adictivos en los seres humanos incrementando la vulnerabilidad al abuso de drogas. De esta manera, la interferencia de dicha vía luego de que la sensibilización a cocaína ha sido instaurada, podría ser una herramienta farmacológica útil para reducir la susceptibilidad a la recaída a la droga, restaurando funciones cerebrales en estructuras que forman parte o modulan el circuito de recompensa.

ABSTRACT

Cocaine is one of the most addictive drug and drug addiction one of the most difficult diseases to treat. Despite several efforts to develop effective treatments to prevent relapse to drugs of abuse, there is incomplete information about the neurobiological processes underlying these phenomena. Sensitization refers to long lasting changes in certain behaviors that underlie craving and relapse to different drugs of abuse, once addiction has been established. Although sensitization can be induced by many chronic cocaine administration protocols, this phenomenon occurs only in a proportion of animals exposed to the psychotropic drug. Nitric oxide is a gaseous neurotransmitter that is involved in the acquisition and maintenance of the behavioral effects of cocaine. On the other hand, PDE₅ inhibitors use, such as sildenafil, has been reported, in combination with illegal drugs like cocaine in humans. We investigated the contribution of the nNOS/NO/sGC/cGMP pathway in both the *development* and *expression* of cocaine sensitization, and its importance in the pathological learning process associated with addiction, through the exploration of plastic changes occurring in the hippocampus. We show that repeated cocaine administration induces behavioral sensitization in 50% of treated animals and this correlates with an increase in hippocampal synaptic plasticity. We have also observed an increase in NOS enzyme activity and nNOS protein levels in this structure, only in sensitized animals. These results lead us to propose that, the activation of this signaling pathway nNOS/NO/sGC/cGMP could be considered as one of the mechanisms by which NO is involved in both the development and expression of sensitization and in the plastic phenomenon observed in the hippocampus after repeated cocaine administration. Therefore, we can speculate that up-regulation of the mentioned pathway in different brain areas, could start, contribute or exacerbate addictive behaviors in humans and increase vulnerability to drug abuse. Consequently, the interference of this pathway after cocaine sensitization has been established, could be a useful pharmacological tool to reduce susceptibility to drug relapse, restoring brain functions that modulate the reward circuit.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

El abuso de drogas y el consiguiente fenómeno de la adicción son dos de los problemas sociales más serios y de mayor impacto en la salud pública (Cornish and O'Brien 1996). Numerosas investigaciones se han llevado a cabo en las últimas décadas intentando explicar los mecanismos neurales que subyacen a este fenómeno a fin de que estos conocimientos puedan contribuir al desarrollo de terapias efectivas. A pesar de estos esfuerzos, son pocas las opciones disponibles para tratar con éxito la dependencia a las drogas de abuso. La adicción a una droga se puede considerar como una enfermedad mental que afecta al sistema de recompensa del cerebro y produce una pérdida de control sobre el uso de la misma, lo que induce su búsqueda y consumo compulsivo a pesar de las consecuencias adversas que ello implique.

En los seres humanos, el inicio del consumo de drogas puede deberse a múltiples causas. Sin embargo, no todos los individuos que consumen o han sido expuestos a alguna droga de abuso desarrollan una adicción a dicha sustancia (O'Brien and Anthony 2005). La capacidad de una droga de generar adicción varía en función de las características de la droga. Asimismo, la adicción no se desarrolla tras una primera administración, sino que es un proceso extenso, que empieza con el uso social de la droga y transita luego a una segunda etapa en la que se va perdiendo progresivamente el control sobre la droga y posteriormente se convierte en una conducta adictiva. A pesar de ello, el uso social de la droga no conlleva, por sí solo, a una adicción. Para que ésta se instaure deben confluír en el sujeto factores de vulnerabilidad, propios del individuo como factores genéticos, y factores ambientales que, al operar juntos, facilitarán el desarrollo del trastorno (Mohn et al. 2004). Si bien existe una amplia conciencia social sobre el potencial adictivo de diferentes drogas, en particular de psicoestimulantes como la cocaína, el abuso de esta droga ilegal constituye uno de los principales problemas de salud en nuestra sociedad y en el mundo.

La adicción incluye procesos complejos de índole comportamental y neurobiológico. Todas las drogas de abuso producen efectos de reforzamiento responsables de la iniciación del desorden adictivo. Aunque los determinantes neurobiológicos que contribuyen al comportamiento adictivo siguen siendo desconocidos, se ha establecido que las drogas de abuso usurpan el circuito de

recompensa natural que responde a reforzadores como el alimento, las relaciones sexuales y las interacciones sociales positivas. Sin embargo, otros procesos comportamentales son también cruciales para el mantenimiento de la adicción, incluyendo los síntomas negativos del síndrome de abstinencia y los diferentes estímulos que pueden conducir a la recaída, como por ejemplo las claves o señales asociadas a la administración de la droga, vivencia de situaciones estresantes y la re-exposición a la sustancia (Koob et al. 2004; Nestler 2004).

Una vez desarrollada la adicción, el individuo muestra un anhelo intenso por el consumo de la droga de manera indefinida y un elevado riesgo de recaer en su consumo abuso, incluso años o décadas después de haberlo discontinuado. Esto implica que la droga produce cambios extremadamente estables en el cerebro, que son los responsables de dichas conductas a lo largo de toda la vida (Nestler 2001).

VULNERABILIDAD AL ABUSO DE DROGAS

Si bien la adicción es un estado que se genera como consecuencia del consumo crónico, en algunos individuos este proceso se instala más fácilmente que en otros. Tal como ocurre con ciertas enfermedades, la vulnerabilidad a las drogas de abuso difiere de una persona a otra, dependiendo de varios factores de riesgo presentes en cada individuo y del entorno que frecuenta (Piazza and Le Moal 1996). Por lo tanto, ¿qué factores determinan que una persona se vuelva adicta o no? La accesibilidad a la sustancia, la presión social o económica en ciertos momentos de la vida y la atracción a los efectos físicos que estas sustancias producen, llevan a algunas personas a caer en el abuso de drogas. Muchas veces, el consumo comienza como una experiencia más, en un intento de satisfacer una curiosidad, y normalmente en control de la situación. Pero a medida que el uso de estas drogas continúa de manera repetida, el control se pierde y se desarrolla la adicción.

En los seres humanos, la vulnerabilidad está condicionada por múltiples variables entre las cuales se destacan **factores asociados a la droga**, como el poder adictivo de la sustancia que está relacionado con la capacidad intrínseca de la misma para producir sensaciones placenteras, la vía de administración, el metabolismo de la misma, su costo y disponibilidad. También afectan las **características del consumidor**, tanto biológicas, como la edad y factores genéticos, los cuales explican las diferencias

en el impacto que una misma droga pueda tener sobre distintos individuos; o características psicológicas como sus rasgos de personalidad, estabilidad emocional, estrés, etc. Los **factores ambientales** como el entorno familiar, la falta de alternativas recreativas y modelos sociales inadecuados también condicionan el desarrollo de la adicción. Todos éstos son factores que contribuyen a crear un clima de riesgo, donde la droga puede convertirse fácilmente en una válvula de escape.

La apetencia o deseo intenso (“craving”) por la droga que sufren muchos consumidores regulares es un fenómeno complejo e incompletamente conocido, que resulta tanto de la capacidad de refuerzo positivo de drogas como la cocaína (el placer y la “euforia cocaínica”) como del refuerzo negativo (la recurrencia a ese estímulo placentero debido al malestar que provoca su abstinencia) (Koob and Nestler 1997). La instalación de estos dos procesos opuestos en el cocainómano impulsa la repetición compulsiva de ciclos de intoxicación-apetencia que se producen con diferente gravedad y consecuencia en cada paciente. En las personas más vulnerables, la apetencia progresa muy rápidamente y una vez instalada se dispara por elementos del entorno o del contexto capaz de activar el sistema límbico.

ADOLESCENCIA: PERÍODO CRÍTICO EN EL DESARROLLO DE LA ADICCIÓN

El hecho de asumir ciertos riesgos y el comportamiento de búsqueda y curiosidad por la novedad son características comunes del período de adolescencia (Spear 2000), que pueden conducir a un riesgo mayor de abuso de drogas. Consecuentemente, esta etapa es considerada un período crítico para el desarrollo de las conductas adictivas, tanto en humanos como en modelos animales (Koob and Le Moal 2008). En los humanos, debido a que el juicio y la capacidad para tomar decisiones en la adolescencia todavía no están completamente desarrollados, su habilidad para evaluar los riesgos con exactitud y tomar decisiones sensatas sobre el consumo de drogas puede encontrarse limitada. Debido a los cambios en el desarrollo que se producen en este período, la mayor susceptibilidad a la adicción a drogas está parcialmente asociada a una corteza pre-frontal inmadura. Dicha estructura juega un papel esencial en la ejecución de conductas voluntarias (Miller and Cohen 2001; Corbetta and Shulman 2002). En los seres humanos, la corteza pre-frontal presenta un retraso en el desarrollo en comparación con otras áreas corticales, que se evidencia

por un menor número de espinas dendríticas y la falta de mielinización de axones durante la adolescencia (Sowell et al. 2004; Casey et al. 2005). Estas alteraciones probablemente contribuyan a los comportamientos característicos, tales como la falta de control de la impulsividad y errores en la toma de decisiones, situando a los adolescentes en un mayor riesgo de desarrollar trastornos por el uso de sustancias (Chambers et al. 2003). Otra región que sufre cambios durante la adolescencia es el hipocampo, el cual está especialmente implicada en los procesos de memoria y aprendizaje y desempeña un papel importante en el aprendizaje "patológico" que subyace al comportamiento relacionado con la adicción (Nestler 2002). Estas áreas del cerebro alcanzan la madurez más tarde que las áreas cerebrales sensoriales y motoras primarias, que limitan la capacidad inhibitoria de motivación durante este período del desarrollo. El abuso de las drogas puede afectar estos procesos de maduración y modificar la función cerebral en áreas relacionadas con la motivación, la memoria, el aprendizaje y el control del comportamiento. En estudios en roedores, el modelo de recaída al consumo conocido como *modelo de preferencia condicionada a un sitio* o "Conditioned Place Preference" (CPP) ha demostrado que las ratas "adolescentes" demoran más tiempo en extinguir una conducta y una mayor preferencia por claves asociadas a la exposición a cocaína, lo que sugiere un mayor riesgo de recaída en los adolescentes en comparación con los adultos (Brenhouse and Andersen 2008).

CIRCUITO DE RECOMPENSA

La activación del circuito de recompensa es una característica común en respuesta a la administración de distintas drogas de abuso. Este circuito es el sitio de convergencia de la información motivacional, emocional, contextual y afectiva. Formando parte del mismo se encuentra el núcleo accumbens (NAc) o estriado ventral, el cual, basándose en sus conexiones funcionales y sus fenotipos neuronales, puede ser subdividido en Core y Shell (Zahm and Brog 1992). El NAc Core es la porción central del estriado ventral que rodea a la comisura anterior y es una continuación funcional del estriado dorsal. Se ha demostrado que es particularmente importante en el aprendizaje instrumental como en la reinstalación de la conducta de auto-administración inducida por claves asociadas al consumo de la droga (McFarland and Kalivas 2001). El NAc Shell comprende la porción más ventral y medial y cumple un rol

importante en la recompensa, las conductas motivacionales, la sensibilización conductual y los cambios en el estado afectivo (Zahm and Brog 1992).

Una antigua concepción denomina al NAc como la interface entre los sistemas límbico y motor, por lo cual, el NAc sería el sitio clave para la transferencia de las señales motivacionales y emocionales a las respuestas conductuales adaptativas. A pesar de su calificación como el "centro de recompensa" del cerebro, cada vez más pruebas apoyan la idea de que el NAc es una estructura bivalente que procesa estímulos emocionales positivos y negativos tanto en el acercamiento como en el comportamiento de evitación (Reynolds and Berridge 2002; Roitman et al. 2005; Carlezon and Thomas 2009). Esto tiene consecuencias importantes para la comprensión de la adicción, ya que las drogas de abuso proporcionan señales emocionales positivas (droga, "high") y negativas (abstinencia adrogas, "crash") en el NAc.

Además de este núcleo, el circuito de recompensa está formado por otras estructuras tales como el área tegmental ventral (VTA, *-del inglés- Ventral Tegmental Area*), y la corteza pre-frontal. Las interconexiones entre estas áreas constituyen los principales circuitos neuronales implicados en la neurobiología de la adicción. Sin embargo, otras áreas del cerebro, tales como la amígdala y la formación del hipocampo, están implicados en la iniciación y mantenimiento de la adicción a drogas (Eisch and Mandym 2004).

El NAc actúa como una puerta de entrada para estímulos recompensantes o aversivos y además recibe aferencias que provienen de regiones cerebrales que se sabe son importantes para el procesamiento de estímulos emocionales tanto positivos como negativos, como la amígdala basolateral (Kelley et al. 1982), y para las conductas voluntarias, como la corteza orbitofrontal, la ínsula, la corteza cingulada (Berendse et al. 1992), y los núcleos del tálamo (Berendse and Groenewegen 1990). Además, el NAc recibe abundante inervación del subículo ventral del hipocampo (Kelley and Domesick 1982) que proporciona información espacial y contextual acerca de diferentes estímulos (Brog et al. 1993; Sesack and Grace 2010). La gran mayoría de las conexiones aferentes que recibe el NAc son de tipo glutamatérgicas, provenientes del hipocampo, corteza pre-frontal y amígdala, que proporcionan la unidad excitadora necesaria para evocar el comportamiento. El NAc también recibe aferencias inhibitorias GABAérgicas

desde el pálido ventral y el VTA, así como conexiones inhibitorias locales por interneuronas ubicadas en el mismo NAc (Brog et al. 1993; Sesack and Grace 2010). Finalmente, las aferencias dopaminérgicas de VTA proveen un componente esencial en el procesamiento de la recompensa en el NAc, ya que la dopamina liberada en el NAc modula la excitabilidad general de las neuronas, aumentando o disminuyendo los comportamientos que dependen de este núcleo (Koob 1992; Ikemoto and Panksepp 1999; Wise 2004)(Figura 1).

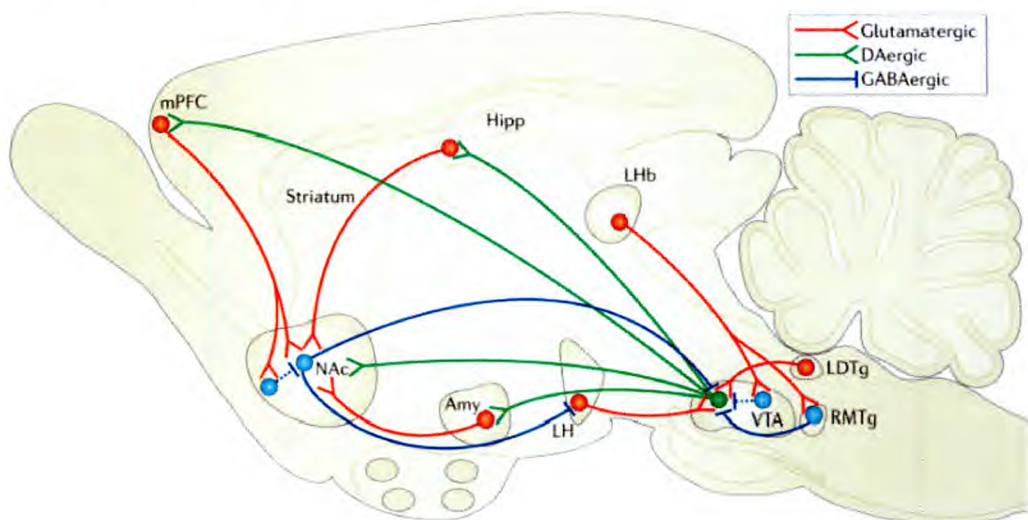


Figura 1: Circuito de recompensa en el cerebro humano. *Fuente:* SJ Russo and EJ Nestler (2013). *Nature Reviews Neuroscience*. Abreviaturas: **mPFC:** medial prefrontal cortex; **Hipp:** hippocampus; **VTA:** ventral tegmental area; **Amy:** amígdala; **LHb:** lateral habenula; **LH:** lateral hypothalamus; **LDTg:** lateral dorsal tegmentum; **RMTg:** rostromedial tegmentum.

EL HIPOCAMPO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MEMORIA Y LA ADICCIÓN

El **Hipocampo** es una estructura que forma parte del sistema límbico, localizado en el lóbulo temporal medial del cerebro. La corteza entorrinal es la mayor fuente de aferencias del hipocampo y está conectada con otras áreas de la corteza cerebral actuando de esta manera como interfaz entre esta estructura y otras partes del cerebro. El hipocampo participa en diferentes procesos dependientes del contexto (Sinha 2001) y envía proyecciones glutamatérgicas hacia el NAc a través del subículo, jugando un rol importante en la modulación de la función dopaminérgica en el NAc, ya que la estimulación eléctrica y química del subículo ventral del hipocampo incrementa los niveles de dopamina en el NAc, efecto que puede ser mediado directamente por

activación de receptores glutamatérgicos en esta área (Taepavarapruk et al. 2000), o indirectamente vía subículo-NAc-VTA (Kelley and Domesick 1982; Kelley et al. 1982; Floresco et al. 2001). Estudios electrofisiológicos y neuroquímicos indican que la exposición repetida a psicoestimulantes en ratas, produce un incremento de la neurotransmisión glutamatérgica excitatoria en VTA y en NAc (Pierce et al. 1996; Kalivas and Duffy 1998), como así también en el hipocampo (Thompson et al. 2004). De esta manera cambios generados a nivel neuroquímico y/o en la actividad neuronal en el hipocampo pueden modificar o modular la funcionalidad del sistema dopaminérgico mesolímbico, teniendo un rol crítico tanto en diversas formas de plasticidad sináptica (Hernandez et al. 2002), como en el comportamiento patológico que subyace a la adicción. Ha sido descripto también que diferentes drogas adictivas tienen la capacidad de aumentar la expresión del factor de transcripción Δ FosB en el gyrus dentado hipocampal (Perrotti et al. 2008). Este factor es el encargado de modular ciertas proteínas que inducen cambios morfológicos en las neuronas, formación de espinas dendríticas y alteraciones de la plasticidad neuronal, que podrían ser responsables, en parte, de las alteraciones que se producen en trastornos adictivos.

Asimismo, las drogas de abuso pueden disminuir la neurogénesis en la zona subgranular del hipocampo (zona donde es posible la generación de nuevas neuronas) durante la edad adulta y estos cambios pueden alterar la función de esta estructura de manera tal que contribuyen tanto al mantenimiento del comportamiento adictivo, como a la recaída luego de la abstinencia a la cocaína (Eisch and Harburg 2006; Arguello et al. 2008; Noonan et al. 2008).

En el hipocampo se distinguen diferentes poblaciones neuronales:

- neuronas granulares, glutamatérgicas, cuyos axones son denominados fibras musgosas.
- neuronas polimórficas, ubicadas debajo de las células granulares, en esta capa es donde ocurre la proliferación celular característica del hipocampo (Reznikov 1975).
- neuronas piramidales, también glutamatérgicas, que constituyen el tipo principal de neuronas en esta estructura
- interneuronas de tipo GABAérgicas, que se encuentran ampliamente distribuidas por todo el hipocampo y que expresan oxido nítrico sintasa (Amaral et al. 1991)

El hipocampo presenta un circuito trisináptico en el cual están involucrados: el tracto o vía perforante, las células granulares del gyrus dentado, las fibras musgosas, las neuronas piramidales de CA3, las fibras colaterales de Schaffer, las neuronas piramidales de CA1, y la vía de salida. En este circuito el tracto perforante procedente de la corteza entorrinal se dirige hacia las células granulares del gyrus dentado (primera sinapsis). Luego los axones de estas células establecen sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas piramidales en el área CA3 (segunda sinapsis). Finalmente, los axones de las neuronas piramidales en CA3 salen del hipocampo por el fornix pero además envían colaterales hacia las mismas neuronas piramidales de CA3 y las colaterales de Schaffer hacia las neuronas de CA1 (tercera sinapsis) (Figura 2).

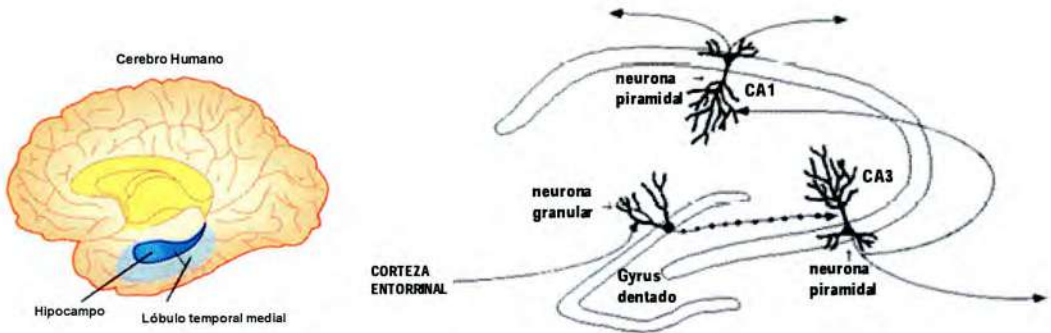


Figura 2: A la izquierda ubicación del hipocampo en el cerebro humano. A la derecha conexiones principales desde la corteza entorrinal hacia las dendritas de las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo.

PLASTICIDAD SINÁPTICA: POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO

En diferentes áreas del circuito tri-sináptico hipocampal se observa una forma de plasticidad sináptica que es requerida para la formación de la memoria y ciertos aprendizajes de tipo asociativo, entendiéndose por **plasticidad** a la capacidad de adaptarse y mejorar su eficiencia funcional en respuesta a estímulos que provienen del medio interno o externo. Los mecanismos que explican los fenómenos de plasticidad en la funcionalidad de un sistema son múltiples. Unas son de carácter neuroquímico; por ejemplo, el incremento en la liberación de neurotransmisores o mediadores en el espacio sináptico, cambios en la actividad de neuronas que influyen sobre la liberación pre-sináptica de los neurotransmisores, aumento del número de receptores post-sinápticos, cambios en la velocidad de inactivación del mediador y cambios en las

cascadas de mensajeros intracelulares, entre otros eventos. Otras son de carácter anatómico, las cuales pueden ser más perdurables e incluso involucran cambios estructurales permanentes, por ejemplo, modificaciones en las espinas dendríticas y traslocación de contactos sinápticos (Bi and Poo 1998).

En los mamíferos los mecanismos sinápticos implicados en los procesos de aprendizaje son muy complejos. Las primeras sinapsis identificadas en cerebro de animales donde fue posible explicar los cambios que acontecen y son base de la plasticidad sináptica propia de algunos procesos de memoria, fueron las conexiones excitatorias entre el tracto perforante y las células granulares del giro dentado hipocampal. Por primera vez, en el año 1973, Bliss y Lomo trabajando en hipocampo de conejos demostraron que un breve tren de estimulación de alta frecuencia en esta vía excitatoria del hipocampo causa un incremento sostenido en la eficiencia de la transmisión sináptica (Bliss and Lomo 1973; Bliss and Collingridge 1993). Este efecto descrito como *Potenciación a Largo Plazo* o "Long Term Potentiation" (LTP) ha sido estudiado en diferentes especies, desde roedores hasta primates (Nosten-Bertrand et al. 1996) y puede generarse en todas las sinapsis excitatorias del hipocampo así como también en otras estructuras cerebrales como amígdala, cerebelo, corteza, etc, presentando características particulares en cada una de ellas. Estudios posteriores in vivo mostraron que, utilizando múltiples electrodos, las magnitudes relativas de los potenciales post-sinápticos excitatorios de campo (*fEPSPs-del inglés- field Excitatory Post Synaptic Potentials*) registrados en varias sinapsis dentro del hipocampo y evocados por un único electrodo de estimulación, son modificadas durante el aprendizaje (Whitlock et al. 2006). Dicha LTP en el hipocampo requiere de la participación de glutamato en las sinapsis de giro dentado y CA1. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central que, una vez sintetizado, se almacena en vesículas en las terminales pre-sinápticas de neuronas glutamatérgicas hasta la llegada de un potencial de acción, el cual provoca la fusión de dichas vesículas a la membrana pre-sináptica y la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico. Posteriormente el glutamato liberado actúa en las células blanco por unión a receptores ionotrópicos específicos que son de tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol (AMPA), N-methyl-d-aspartate (NMDA) y kainato; o a través de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G activando segundos mensajeros. Durante la

transmisión sináptica normal, o de baja frecuencia, los receptores AMPA son los responsables del nivel de despolarización de la membrana, ya que los canales de los receptores NMDA se encuentran bloqueados por Mg^{+2} . Solamente cuando la membrana de la célula post-sináptica es adecuadamente despolarizada por acción cooperativa y simultánea de varias neuronas pre-sinápticas, estos receptores son desbloqueados desplazando al ion Mg^{+2} del interior del canal, el cual queda libre para permitir un aumento de la conductancia al Ca^{2+} hacia el interior celular. Esta entrada masiva de Ca^{2+} en la célula post-sináptica desencadena una cascada de reacciones bioquímicas de gran trascendencia para la generación del LTP. La concentración intracelular elevada de calcio activa diversas quinasas; protein-quinasa A (PKA), protein-quinasa C (PKC), quinasas dependiente de calcio como la Ca^{2+} /calmodulina quinasa (CaMKII) y protein-quinasa de tirosina (fyn), entre otras (Martin et al. 2000). Las quinasas mencionadas son las encargadas de fosforilar proteínas y activar ciertos factores de transcripción los cuales activan genes de acción tardía, de inicio más lento y mayor duración, capaces de codificar diversas proteínas, tales como fosfolipasa C (PLC), sinaptofisina, TrkA, TrkB (receptores para tirosina-quinasa) y la subunidad 2B del receptor NMDA. Existen además mecanismos que, iniciados en el compartimento post-sináptico, actúan retrógradamente en la terminal pre-sináptica facilitando la liberación sostenida de glutamato desde la neurona pre-sináptica. Se ha postulado que uno de estos mecanismos es la producción de óxido nítrico. La activación de la CaMKII induce la activación de la óxido nítrico sintasa y por consiguiente la síntesis de NO, este mediador difunde al espacio sináptico y penetra en la pre-sinapsis para facilitar la liberación de glutamato, además de generar eventos post-sinápticos como la producción de guanosin monofosfato cíclico (GMPC) luego de la activación de guanilato ciclasa (GC), adenosin monofosfato cíclico (AMPC), o nitrosilar proteínas.

COCAINA

La cocaína ($C_{17}H_{21}NO_4$), metiléster de benzoilecgonina, es un alcaloide que se extrae de las hojas de dos especies de arbustos (*Erythroxylum coca lam* y *Erythroxylum novogranatense*) (Figura 3A), cultivados en las regiones tropicales de los Andes y consumido ya por las civilizaciones preincaicas. Los aborígenes andinos masticaban las hojas de coca para disminuir las sensaciones de hambre y de fatiga, mezclándolas con

ceniza que, al ser alcalina, libera la base cocaína, que atraviesa fácilmente la mucosa de la boca. Se distribuyó en Europa en 1580 y su principio activo fue aislado en 1860. Sus propiedades como anestésico local se descubrieron en 1870, pero luego su uso en la clínica fue prohibido debido a sus propiedades adictivas. La cocaína suele consumirse, de manera ilegal, habitualmente en forma de clorhidrato ya sea inhalada por vía intranasal, inyectada por vía intravenosa o fumada en cigarrillos con tabaco por vía pulmonar. Los efectos de la cocaína intranasal se empiezan a percibir al cabo de 3-5 min y alcanzan su máximo a los 10-20 min fumada o por vía intravenosa se producen a los 8-10 segundos y desaparecen en pocos minutos. La rapidez de inicio y finalización del efecto otorga una gran capacidad reforzadora a estas vías de administración, ya que atraviesa rápidamente las membranas corporales, incluidas las barreras placentaria y hematoencefálica (Koob and Bloom 1988).

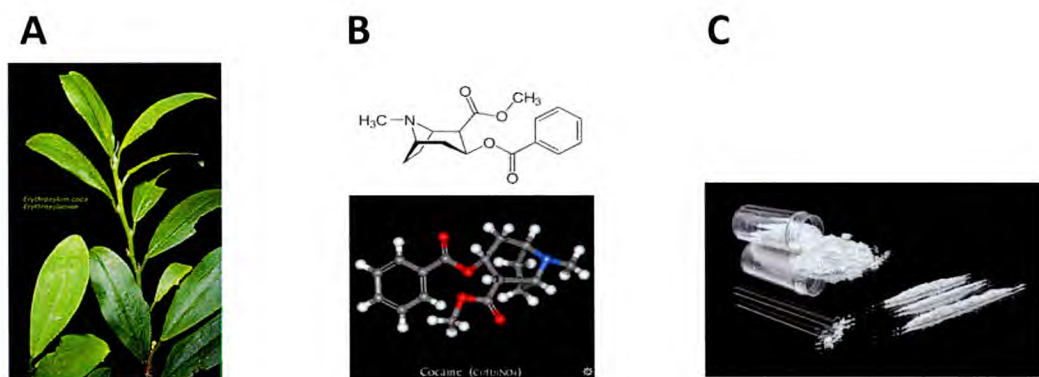


Figura 3: A) Hojas de coca, *Erythroxylum coca*, B) Estructura química (C₁₇H₂₁NO₄) y molécula de cocaína, C) clorhidrato de cocaína en polvo.

La cocaína actúa farmacológicamente inhibiendo la recaptación de dopamina, serotonina y noradrenalina en el espacio sináptico, incrementando de esta manera los niveles extracelulares de dichos neurotransmisores, y produciendo un sentimiento de euforia (Robinson and Berridge 2000; Koob and Le Moal 2008). La literatura sugiere que los efectos de refuerzo de la cocaína son primariamente mediados por la intensificación de la transmisión de dopamina en el circuito de recompensa (Anderson and Pierce 2005). De esta manera usurpa los circuitos cerebrales de recompensa normalmente involucrados en las sensaciones de placer generadas por reforzadores naturales como la comida, el sexo o las interacciones sociales, produciendo un efecto

placentero mayor que cualquier reforzador natural. En otras palabras, mimetizan los efectos de los estímulos reforzadores naturales y falsean el papel normal de las neuronas dopaminérgicas.

La cocaína es una de las drogas de abuso más adictiva que se conoce debido a la alta capacidad de producir dependencia, siendo también una de las drogas que más daño físico produce ante la administración repetida (Nutt et al. 2007)(Figura 4).

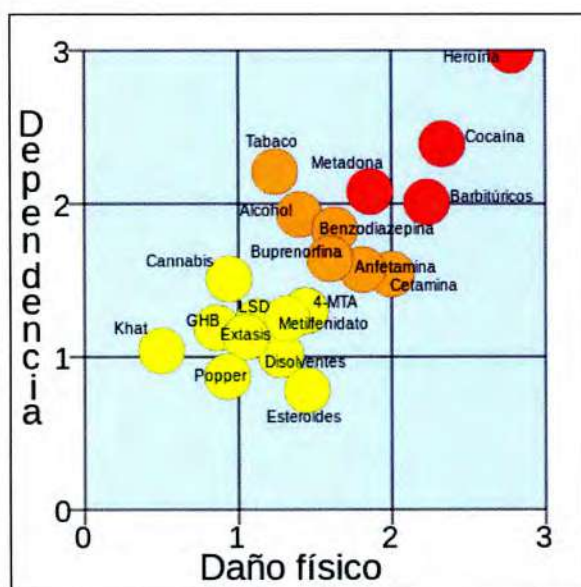


Figura 4: Escala de clasificación de los daños originados por las diferentes drogas. *Fuente:* Artículo de David Nutt, Leslie A King, William Saulsbury, Colin Blakemore. "Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse" *The Lancet* 2007; 369:1047-1053.2007.

MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA ADICCIÓN: La Sensibilización Comportamental

Existen diversos tipos de ensayos comportamentales que se utilizan como modelos de adicción a drogas, tanto para estudiar la vulnerabilidad como los diferentes aspectos de la naturaleza progresiva de la adicción. Estos incluyen la medición de la respuesta aguda ante la administración de una sustancia, la sensibilización, la preferencia condicionada, la tolerancia, la abstinencia, la adquisición de auto-administración, la extinción y la recaída al consumo.

Ciertos estímulos del medio exterior, presentados de manera repetida, pueden generar modificaciones a largo plazo en el funcionamiento del sistema nervioso. La plasticidad anatómica y funcional desempeña un papel esencial en la adaptación

comportamental al medio, puesto que permite al organismo modificar su comportamiento en función de experiencias pasadas. Sin embargo, en algunas situaciones donde la capacidad de ajuste del organismo se encuentra sobrepasada (stress, consumo de droga), dicha plasticidad puede generar o contribuir a conductas erróneas de adaptación. El uso repetido de ciertas drogas puede generar disminución de algunos efectos (“tolerancia”) con las administraciones repetidas, mientras que otros pueden potenciarse (“sensibilización”). El que ocurra uno u otro fenómeno depende, en parte, del patrón de administración de la droga. Numerosos trabajos demostraron que, los animales que reciben varias inyecciones de droga espaciadas en intervalos de tiempo de días o más, tienden a mostrar una mayor actividad locomotora y estereotipia, que aumentan progresivamente con cada inyección (sensibilización). En cambio, aquellos que reciben la droga de manera continua a través de una bomba osmótica, o por administraciones repetidas a intervalos cortos de tiempo, muestran una respuesta locomotora disminuida cuando se les re-expone a la droga (tolerancia) (Kuribara 1996; Pudiak et al. 2014). Sin embargo, se sabe que los cambios neuronales responsables de la tolerancia y la sensibilización pueden coexistir.

La sensibilización comportamental inducida por cocaína o anfetamina, es un buen ejemplo de una conducta errónea de adaptación. Uno de los modelos experimentales con animales más conocido y aceptado para evaluar la sensibilización comportamental es el **modelo de sensibilización a la actividad locomotora**. La exposición repetida a psicoestimulantes como la cocaína induce un aumento progresivo de la actividad motora en numerosas especies, incluido el ser humano (Robinson and Becker 1986; Kalivas and Stewart 1991; Vanderschuren and Kalivas 2000; Robinson and Berridge 2003). Este fenómeno se asocia a cambios plásticos en circuitos nerviosos que, además de incrementar el valor motivacional de las drogas, subyacen al fenómeno de ansia por la droga o *craving* una vez que se discontinúa el consumo. La sensibilización se asocia, a nivel experimental, con cambios conductuales y de plasticidad molecular y celular que perduran en el tiempo, incluso por años en roedores y se asemeja a algunas de las características relacionadas con la adicción en los seres humanos (Everitt and Wolf 2002; Robinson and Berridge 2003; Kalivas and Volkow 2005; Steketee and Kalivas 2011).

La sensibilización comportamental está directamente relacionada a la expresión del estado de preocupación/anticipación, por lo cual es un modelo animal validado para estudiar el estado de búsqueda o *craving*, y el desarrollo de la adicción (Robinson and Berridge 1993). El *craving* ha sido propuesto como uno de los elementos claves en la recaída de individuos adictos (Koob and Volkow 2010), y dentro del proceso de sensibilización, el tiempo de abstinencia constituye un factor determinante para la consolidación de los cambios neurales así como también para la incubación del *craving* (Kalivas and Duffy 1993; Pierce and Kalivas 1997).

El proceso de sensibilización conductual incluye dos fases distintas: la inducción o desarrollo y la expresión. La fase de **inducción o desarrollo** se refiere al período en que se observa el aumento de la respuesta del comportamiento después de cada administración de cocaína, mientras que los cambios que aparecen semanas después de la discontinuación del consumo o tratamiento están asociados con la **expresión**, ya que la sensibilización comportamental continúa aumentando después de la suspensión de la administración de cocaína por períodos prolongados (Kalivas and Stewart 1991; Vanderschuren and Kalivas 2000; Steketee and Kalivas 2011). A pesar de que este fenómeno ha sido estudiado principalmente en animales de experimentación, la plasticidad neuronal que subyace a la sensibilización comportamental sugiere la existencia de neuroadaptaciones que contribuyen al ansia compulsiva por la droga en humanos (Kalivas and Duffy 1990; Robinson and Berridge 1993; Kalivas et al. 1998). En otras palabras, podría decirse que la **inducción o desarrollo** de la sensibilización está definida como la secuencia transitoria de eventos moleculares y celulares activados por la administración de psicoestimulantes que llevan a fijar los cambios en la función neuronal, y la **expresión** es la manifestación de las alteraciones celulares a largo plazo que surgen de la fase de inducción y se muestran directamente mediante la respuesta comportamental aumentada.

Ha sido descrito que la iniciación de la sensibilización se debe principalmente a las acciones de diferentes drogas en el VTA y corteza pre-frontal medial, mientras que los efectos de las mismas en NAc serían responsables de la expresión de la sensibilización (Kalivas and Weber 1988). Además del sistema mesocorticolímbico (VTA, NAc y corteza pre-frontal medial), otras estructuras como el pálido ventral, el hipocampo, la amígdala, el tegmento dorsolateral (LDT), y el núcleo paraventricular

(PVN) del tálamo desempeñan un papel importante en el desarrollo de la sensibilización. La participación del hipocampo en el desarrollo de sensibilización es controversial, ya que algunos estudios mostraron que esta estructura no participaría en dicho desarrollo (Wolf et al. 1995; Young and Deutch 1998); mientras que otros demostraron que la inactivación del hipocampo dorsal pero no del hipocampo ventral es capaz de bloquear la expresión de sensibilización (Degoulet et al. 2008). En contraposición con este hallazgo, otro estudio demostró que la sensibilización a amfetamina depende de una mayor activación de neuronas del hipocampo ventral, las cuales incrementan la actividad de las neuronas dopaminérgicas de VTA (Lodge and Grace 2008).

Los cambios producidos por la sensibilización en las distintas áreas cerebrales incluyen alteraciones de la morfología y densidad de dendritas y espinas dendríticas (Robinson and Kolb 1999), cambios en la densidad de receptores post-sinápticos (Pierce and Kalivas 1997), aumento de la transmisión dopaminérgica mesolímbica (Fernandez-Espejo 2006) y alteraciones en las proyecciones glutamatérgicas límbicas y corticales hacia el NAc (Kalivas 2004; Wolf 2010).

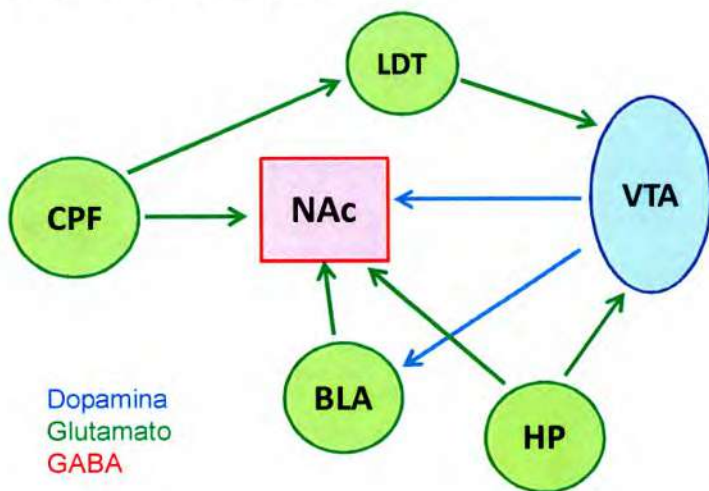


Figura 5: Circuito neuronal implicado en la sensibilización. El núcleo accumbens (NAc) sirve como un output a los circuitos motores. El NAc es modulado por la entrada de la dopamina desde el área tegmental ventral (VTA) que proyecta directamente o lo hace indirectamente a través de la amígdala basolateral (BLA). El NAc también recibe aferencias glutamatérgicas directas desde el hipocampo (HP) y corteza pre-frontal (CPF) o indirectas vía el tálamo dorsolateral (LDT) y VTA. El VTA también recibe proyecciones glutamatérgicas desde el hipocampo.

Experimentalmente, en los animales que reciben dosis repetidas de drogas adictivas, se observan dos tipos de cambios neuroadaptativos diferentes:

- adaptaciones neuronales, las cuales son, principalmente, respuestas homeostáticas a una estimulación excesiva
- plasticidad sináptica, la cual conduce a la asociación de estímulos relacionados con la droga y comportamientos de aprendizaje específicos (Berke and Hyman 2000)

OXIDO NITRICO

El descubrimiento de la función del óxido nítrico (*NO-del inglés- nitric oxide*) como una molécula de señalización en el sistema nervioso cambió radicalmente el concepto de la comunicación neuronal (Esplugues 2002). Las propiedades físicas del NO impiden su almacenamiento en vesículas celulares y su metabolismo mediante enzimas hidrolíticas, a diferencia de los neurotransmisores “clásicos”. El NO se sintetiza por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (*NOS-del inglés- nitric oxide synthase*) dependiendo de su demanda y difunde desde las células donde se produce. Aunque su vida media es de unos pocos segundos, es capaz de difundir ampliamente (distancia de difusión entre 10 – 300 μm de diámetro; (Lancaster 1994), lo cual conlleva a que las estructuras en la vecindad de las células que lo producen, tanto neuronas como glía, vasculatura, etc., estén influenciadas por su liberación, ya que puede atravesar las membranas celulares con facilidad. Esto implica que, además de actuar como un neurotransmisor, el NO tiene un papel neuromodulador (Garthwaite and Boulton 1995). La particularidad de poder difundir dentro de las células le permite interactuar con las dianas intracelulares que normalmente son consideradas mensajeros secundarios. Asimismo, a diferencia de los neurotransmisores convencionales, en los cuales su actividad termina mediante mecanismos de recaptación o por degradación enzimática, la inactivación del NO se produce cuando éste reacciona con un sustrato (Esplugues 2002). La síntesis de NO es el resultado de varios eventos de óxido-reducción enzimática que necesitan una gran cantidad de cofactores, que tienen sitios de unión específicos en la proteína. Este proceso se lleva a cabo por la NOS en dos pasos sucesivos en los que se consume O_2 y NADPH y, como resultado, la L-arginina se transforma en L-citrulina (Figura 6). Los cofactores para la reacción no tienen un papel secundario, sino que su disponibilidad es crucial para la actividad de la enzima (Palmer et al. 1988).

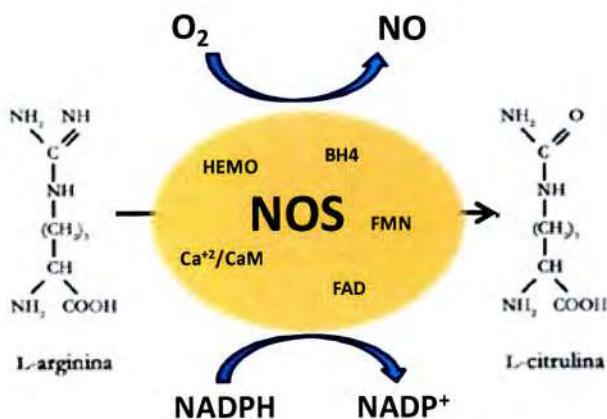


Figura 6: Síntesis de NO por la óxido nítrico sintasa (NOS). Mediante la acción de la NOS la L-arginina se transforma en L-citrulina, liberando NO. Para ello se emplea nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y O₂, además de diversos cofactores como la calmodulina (CaM), el flavín-adenín-dinucleótido (FAD), el flavín mononucleótido (FMN), la protoporfirina IX (el grupo hemo) y la tetrahidrobiopterina (BH₄).

Se han identificado 3 isoformas principales de la NOS que, dependiendo del orden cronológico en el que se aislaron o el tejido en el que se localizan principalmente, se denominan **NOS_n o NOS1** y **NOS_e o NOS3**, ambas de expresión fundamentalmente constitutiva, y **NOS_i o NOS2**, de expresión inducible principalmente (Forstermann et al. 1991; Knowles and Moncada 1994). Sin embargo, a pesar de su nomenclatura, tanto la NOS_n como la NOS_e pueden ser expresadas bajo determinadas condiciones fisiológicas, mientras que la NOS_i puede encontrarse de forma constitutiva en algunos tipos celulares (Moncada 1997). Todas las isoformas de la NOS tienen las mismas propiedades catalíticas, pero difieren en la localización cromosómica de sus genes, en sus secuencias primarias, en la fortaleza de la unión entre los monómeros, en su dependencia de Ca²⁺ y en su regulación (Knowles and Moncada 1994).

En el SNC, la isoforma de la NOS más característica es la NOS_n, aunque la NOS_e y la NOS_i también están presentes (Esplugues 2002). Además, todos los tipos celulares del sistema nervioso central pueden contener la enzima: la NOS_n se expresa fundamentalmente en determinadas poblaciones neuronales y astrogiales; la NOS_e, aparte del endotelio de los vasos sanguíneos, se puede localizar en ciertas neuronas, mientras que la expresión de la NOS_i se localiza en la microglía y los astrocitos. Principalmente, la expresión de la NOS_i puede ser inducida en determinadas

condiciones patológicas tanto en neuronas como en células gliales (Knowles and Moncada 1994; Heneka and Feinstein 2001).

La **NOSn** es una enzima dimérica que contiene un dominio oxigenasa y otro reductasa, cada uno con su propia actividad catalítica (Figura 7). El dominio oxigenasa contiene los sitios de unión de la protoporfirina IX (el grupo hemo) y la tetrahidrobiopterina (BH_4), y tiene un sitio de unión a la calmodulina (CaM). Esta proteína ancla el dominio oxigenasa al reductasa, el cual contiene los sitios de unión de flavín-mononucleótido (FMN), de flavín-adenín-dinucleótido (FAD) y de NADPH (Alderton et al. 2001; Bruckdorfer 2005). Tanto la NOSn como la NOSe contienen un inserto en medio de la zona de unión a FMN que sirve de región auto-inhibitoria, desestabilizando la unión de CaM a bajas concentraciones de Ca^{2+} y, como consecuencia, inhibiendo la transferencia de electrones desde el FMN al grupo hemo. La NOSn contiene además un dominio PDZ (Figura 7) que participa en la formación de los dímeros, además de interactuar con diversas proteínas en regiones específicas de la célula (Kone et al. 2003). Las proteínas que contienen los dominios PDZ se localizan típicamente en contactos célula a célula especializados y, usualmente, anclados a componentes de diversas vías de transducción de señales, formando complejos ternarios. Las interacciones del dominio PDZ de la NOSn influyen en la actividad y/o en la distribución sub-celular de la proteína (Kone 2000). Entre las proteínas a las que puede anclarse por su dominio PDZ en las neuronas, se encuentra la proteína de densidad post-sináptica que contiene también el dominio PDZ (*PSD-95 -del inglés PDZ-containing post-synaptic density protein-95*). El receptor NMDA está acoplado a la NOSn por medio de la proteína PSD-95 formando un complejo; cuando este receptor se activa, el Ca^{2+} que entra a la célula a través de él activa específicamente a la NOSn. Otra proteína a la que la NOSn se puede unir es CAPON, un ligando PDZ que se une al sitio terminal COOH- de la NOSn (*-del inglés- COOH-terminal PDZ ligand of NOSn*) y la libera de su unión a PSD-95, regulando de esta forma la producción de NO (Jaffrey et al. 1998).

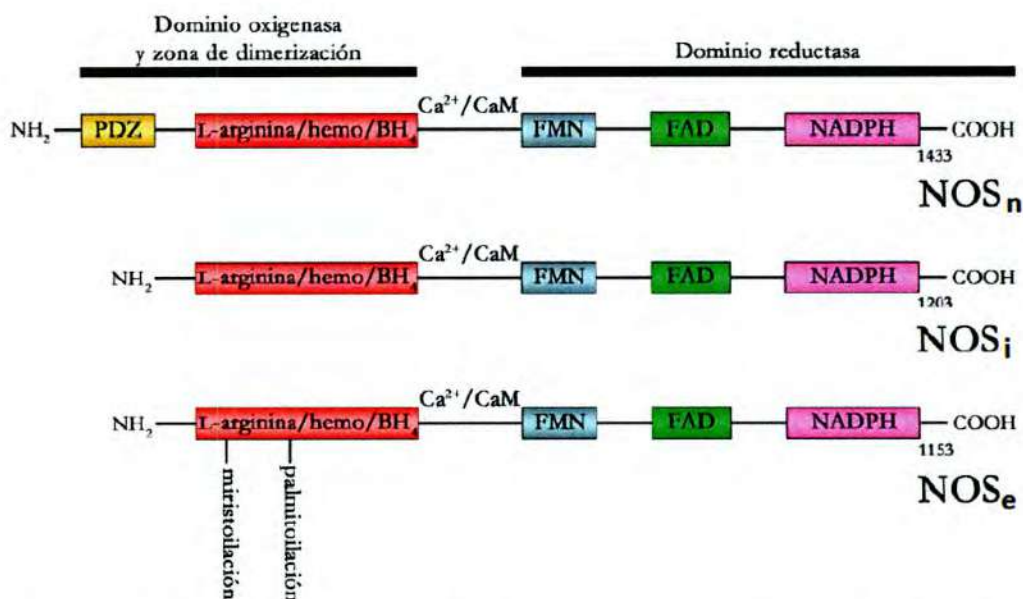


Figura 7: Estructura general de los monómeros de las tres isoformas principales de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), con las zonas de unión de los diferentes cofactores: la calmodulina (CaM), el flavín-adenín dinucleótido (FAD), el flavín-mononucleótido (FMN), el grupo hemo, el nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y la tetrahidrobiopterina (BH₄). La NOS tiene un dominio reductasa y otro oxidogenasa, por el que, además, se produce la dimerización, que es una condición imprescindible para su activación. La NOS_n posee una longitud de 1433 aminoácidos, la NOS_i tiene 1203 y la NOS_e 1153. Además de las zonas de unión de los diferentes cofactores, la NOS_n contiene un dominio PDZ, mientras que la NOS_e tiene una zona de miristoilación y otra de palmitoilación. *Fuente:* modificado de Bruckdorfer R, "The basics about nitric oxide". *Mol Aspects Med* 26:3-31 (2005)

El gen de la NOS_n es el más complejo de los descritos en humanos, tanto en su estructura como en la regulación de su expresión (Wang et al. 1999). El análisis de la secuencia de ADN ha revelado que su transcripción puede ser regulada por gran cantidad de elementos, entre ellos la proteína de unión al elemento de respuesta al adenosín monofosfato cíclico (AMPC) o proteína CREB (*-del inglés-cyclic-AMP-response-element-binding*)(Sasaki et al. 2000).

EL OXIDO NITRICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

En el sistema nervioso, el NO se produce principalmente en interneuronas nitrérgicas locales ubicadas en diversas estructuras cerebrales (Bredt et al. 1990) y en células gliales, pero también en otros tipos celulares, como en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y en las neuronas del plexo mientérico del sistema nervioso periférico, entre otros (Guix et al. 2005). La activación de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y AMPA promueven la síntesis de NO (Garthwaite 1991; Boehning and

Snyder 2003), y puede ser liberado tanto por las terminales nerviosas como por los axones y el soma. El NO puede activar diferentes vías de señalización (Garthwaite 2008; Mustafa et al. 2009): activa la enzima GCs estimulando la producción de GMPc (Karatinos et al. 1995; Mustafa et al. 2009; Garthwaite 2010); también puede estimular la producción de AMPc y además puede reaccionar directamente con proteínas que contengan grupos sulfhidrilos de cisteína, fenómeno que se denomina S-nitrosilación de proteínas (Stamler et al. 2001; Garthwaite 2008).

Las acciones biológicas más significativas del NO se deben a su unión a metales de transición (Yun et al. 1996). El NO se une con el hierro presente en los grupos hemo de gran cantidad de proteínas, regulando su actividad. Se ha comprobado que puede inhibir a diversas enzimas que emplean el grupo hemo para ejercer su función, como la propia NOS, regulando de esta manera su producción (Assreuy et al. 1993; Rengasamy and Johns 1993). Otras proteínas diana que contienen el grupo hemo son la catalasa, la citocromo c oxidasa, la hemoglobina y la peroxidasa, además de la GCs, su principal diana biológica (Ignarro 1991).

El NO se une al hemo de la GCs de forma reversible e induce un cambio conformacional que activa la enzima, incrementando los niveles de GMPc (Yun et al. 1996; Bruckdorfer 2005). La actividad basal de la GCs puede incrementarse más de 200 veces por la unión de NO, aunque este complejo NO-GCs tiene una vida media de solo 0,2 segundos (Bruckdorfer 2005). A pesar de que se le denomine como “soluble”, se ha demostrado que la GCs puede unirse a la proteína PSD-95, por lo que también está asociada a las membranas sinápticas en células del encéfalo (Russwurm et al. 2001). Además, como se mencionó anteriormente, la PSD-95 forma complejos con NMDA y NOSn. Esto permite que la entrada de Ca^{+2} mediante el receptor NMDA active la NOSn, y el NO producido interactúe rápidamente con su principal diana fisiológica, la GCs (Christopherson et al. 1999; Russwurm et al. 2001). Por otro lado, también se ha visto que la GCs puede localizarse pre-sinápticamente, mientras que la NOSn está situada post-sinápticamente, por lo que el NO actuaría como un neurotransmisor retrógrado (Burette et al. 2002)(Figura 8). Asimismo, la NOSn puede localizarse en prolongaciones muy próximas a otras sinapsis, pudiendo modular tanto la liberación de neurotransmisores por parte del terminal pre-sináptico como la respuesta de la célula post-sináptica (Kiss and Vizi 2001; West et al. 2002).

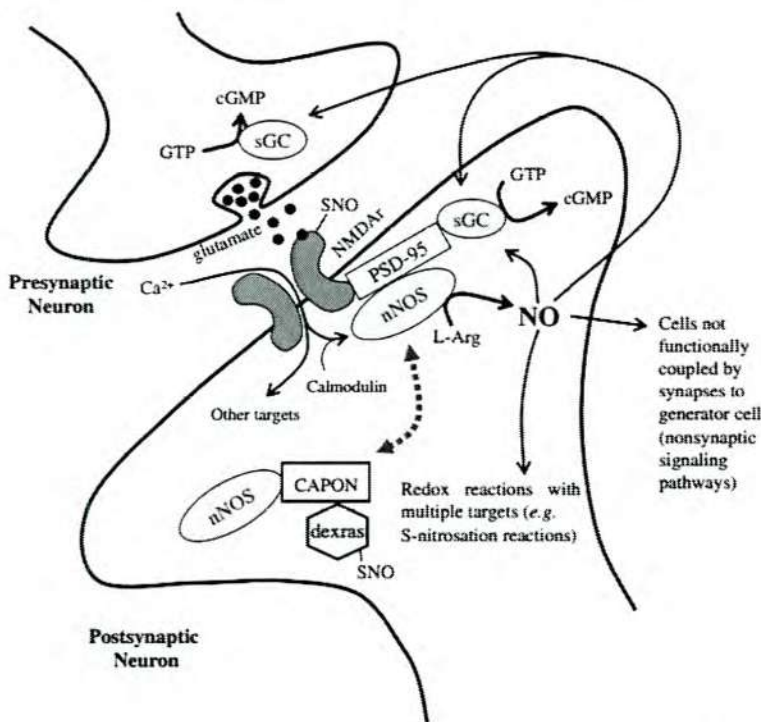


Figura 8: Acoplamiento funcional del receptor NMDA con la NOSn y las vías de señalización de NO. La interacción de los receptores NMDA con NOSn través PSD-95 facilita la síntesis de NO luego del influjo de Ca^{2+} . La proteína adaptadora CAPON regula el complejo supramolecular de síntesis de NO, vinculando la NOSn a objetivos específicos (por ejemplo, las proteínas G pequeñas, como Dexas). Las vías de señalización intra e intercelular están mediadas por la interacción con GCs y los grupos tiol. El receptor NMDA es regulado negativamente por S-nitrosilación de un residuo crítico de cisteína. Fuente: Laranjinha J, *Molecular Aspects of Medicine* 25 (2004) 75–89.

En el sistema nervioso central, el NO participa en distintos procesos, como en el desarrollo embrionario (Bredt and Snyder 1994), en la neurotoxicidad asociada a diversos procesos neurodegenerativos y en la transmisión sináptica (Yun et al. 1996; Bruckdorfer 2005; Guix et al. 2005).

Por otra parte, el NO tiene un papel controvertido en la apoptosis celular, aunque los estudios más recientes tienden a asignarle un papel anti-apoptótico en condiciones fisiológicas (Guix et al. 2005). La inducción de la apoptosis por el NO se debe fundamentalmente a la formación de peroxinitritos, que producen daños en diversos sistemas celulares, como las mitocondrias y el ADN celular. Además, el NO también puede activar proteínas quinasas relacionadas con el daño debido al estrés oxidativo. Finalmente, estos procesos activan la vía de las proteínas caspasas, induciendo la apoptosis (Guix et al. 2005). Por estas razones, el NO se ha relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas los daños

neurológicos asociados a la apoplejía, la esclerosis múltiple, las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Bo et al. 1994; Yun et al. 1996; Dawson and Dawson 1998; Aliev et al. 2009). La acción neurotóxica más estudiada implica un exceso de glutamato que, actuando por medio de los receptores NMDA, promueve la muerte celular (Edelman and Gally 1992; Dawson 1995).

La participación del NO en la liberación de neurotransmisores mediada por el receptor NMDA ha sido estudiada desde la década de los 90 (Montague et al. 1994). Este mecanismo retrógrado es de gran importancia en los procesos de aprendizaje y memoria, como la LTP (Nowicky and Bindman 1993). El efecto del NO en la liberación de glutamato parece depender del nivel de NO: cuando la concentración es baja, se produce una reducción en la liberación de glutamato, aunque los niveles de GMPc sean elevados; mientras que incrementos en la concentración de NO se correlacionan con aumentos en la liberación de glutamato (Sequeira et al. 1997). Además, el NO también influye en la liberación de otros neurotransmisores como el GABA, la acetilcolina, la dopamina y la serotonina, entre otros (Guix et al. 2005).

ROL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA SENSIBILIZACIÓN Y LA ADICCIÓN

La sensibilización a cocaína se ha asociado con el incremento en la actividad de NOSn en distintas regiones del cerebro de ratones (Bhargava and Kumar 1997), también con alteraciones en la liberación de glutamato y dopamina en áreas del sistema dopaminérgico mesolímbico (Kalivas and Stewart 1991; White et al. 1995; Pierce et al. 1996) y con un aumento en la expresión de receptores AMPA de superficie en ciertas estructuras del sistema nervioso central de ratas (Boudreau and Wolf 2005). Además se sabe que la integridad funcional de la señalización por NO es esencial para la expresión de los cambios conductuales inducidos por cocaína, no sólo para el desarrollo de sensibilización sino también para el condicionamiento de preferencia al lugar o CPP (Pudiak and Bozarth 1993; Kim and Park 1995; Haracz et al. 1997; Itzhak et al. 1998). La administración de distintos bloqueantes de NOSn, como NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) o 7-nitroindazole (7-NI), reducen la actividad locomotora en respuesta a cocaína, tanto en la fase de adquisición como en la de extinción de la adicción (Itzhak 1996; Byrnes et al. 2000; Yoo et al. 2006), es decir, que son capaces de bloquear el desarrollo de sensibilización conductual a cocaína (Pudiak and Bozarth

1993; Haracz et al. 1997). Por otra parte, también se sabe que el NO participa en la dependencia a opioides a través de la vía de señalización NOS/GC_c (Garthwaite 1991; Buccafusco et al. 1995; Machelska et al. 1997; Javadi et al. 2013), de alcohol (Rezvani et al. 1995), nicotina (Pogun et al. 2000; Weruaga et al. 2002), cafeína (Kayir and Uzbay 2004), anfetaminas (Itzhak et al. 2004), y cannabinoides (Azad et al. 2001).

VIA DE SEÑALIZACIÓN NOS_n/NO/GC_s/GMP_c

La activación de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y AMPA promueve la síntesis de NO, que activa a la enzima GC_s promoviendo la vía de señalización por GMP_c. El GMP_c es un segundo mensajero, que lleva a la activación de diversas proteínas quinasas dependientes de él (como PKC o PKG), facilitando la fosforilación de diversas proteínas y disminuyendo las concentraciones del Ca²⁺ intracelular por medio de diversos mecanismos (Murad 1994). La disponibilidad de GMP_c no depende solo de su formación, sino que también está críticamente determinada por la actividad de enzimas responsables de su degradación: las fosfodiesterasas (PDE) (Koesling et al. 2005). La enzima PDE de tipo 5 (PDE₅) degrada específicamente a GMP_c en el hipocampo, regulando su actividad. Por todo ello, la interacción del NO con la GC_s puede influir en gran cantidad de procesos intracelulares. Otras proteínas diana del NO incluyen a aquéllas que tienen residuos de cisteína y tirosina, sobre las que actúa por medio de nitrosilación (Yun et al. 1996). Así, por ejemplo, se ha sugerido que el NO puede modular a los receptores NMDA mediante su nitrosilación y disminuir su actividad (Lipton et al. 1993).

Por otra parte, inhibidores de PDE₅ como el citrato de sildenafil (SIL), u otros como vardenafil o tadalafil, son fármacos ampliamente prescritos para la disfunción eréctil, entre otras enfermedades, que producen acumulación o elevación de los niveles de GMP_c (Figura 9).

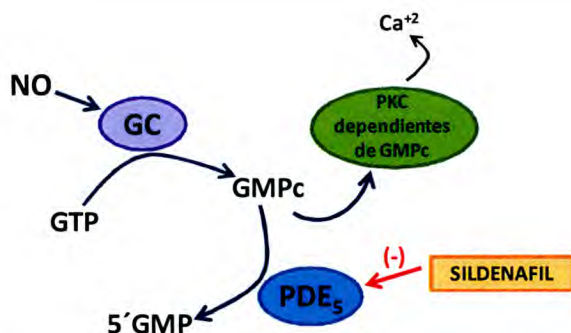


Figura 9: Esquema que muestra la acción de inhibidores de fosfodiesterasa 5 (PDE₅) como el sildenafil. La inhibición de esta fosfodiesterasa produce acumulación de GMPc al evitar su degradación.

El aumento en los niveles de GMPc amplifica el efecto de NO y conduce a la relajación del músculo liso en los cuerpos cavernosos, mecanismo responsable del uso en la disfunción eréctil. La capacidad de sildenafil para cruzar la barrera hematoencefálica y la presencia de PDE₅ en diferentes áreas del cerebro implica que este fármaco puede, además de ejercer efectos sobre la periferia, afectar diversas funciones del SNC (Milman and Arnold 2002; Uthayathas et al. 2007). Ha sido demostrado que, la activación de la vía NO/GMPc estaría implicada en el aprendizaje emocional y la memoria (Komsuoglu Celikyurt et al. 2014) y la acumulación de GMPc en el sistema nervioso central puede relacionarse con la retención de la memoria a largo plazo (Boccia et al. 2011). También, ha sido involucrada en el desarrollo de ansiedad y agresividad en roedores y estaría implicado en la fisiopatología de la depresión (Demas et al. 1997; Kurt et al. 2004; Dhir and Kulkarni 2007; Kulkarni and Dhir 2007; Demirci et al. 2014). Estas conductas, son coincidentes con algunos de los síntomas característicos de la abstinencia a cocaína (Rogerio and Takahashi 1992).

También se conoce que fármacos como el sildenafil son utilizados como mejoradores de la función sexual en hombres sin diagnóstico de disfunción eréctil, y sin prescripción médica. Incluso, el uso recreacional de los inhibidores de la PDE₅ ha sido descrito en diferentes poblaciones (Smith and Romanelli 2005; Tahsili-Fahadan et al. 2006; Lowe and Costabile 2011). Por ejemplo, drogas no aprobadas, con actividad de inhibidores de PDE₅, análogos de sildenafil y vardenafil, se han encontrado en productos herbales utilizados como afrodisíacos (Venhuis et al. 2008), o en productos con ingredientes no declarados (Lowe and Costabile 2011) y también han sido utilizados para adulterar marihuana (Venhuis and de Kaste 2008). Además, resulta

importante destacar que el uso de inhibidores de PDE₅ estaría vinculado con el uso ilícito de cannabinoides en USA (Eloi-Stiven et al. 2007) y con otras drogas recreacionales como cocaína (Aldridge and Measham 1999; Musacchio et al. 2006; Lowe and Costabile 2011) tanto en hombres como en mujeres, con efectos neurológicos tales como disturbios emocionales, amnesia, pérdida de la conciencia y comportamiento agresivo (McCambridge et al. 2006), como así también con una mayor incidencia de contraer enfermedades de transmisión sexual (Fisher et al. 2011). Recientemente, en nuestro país, se realizó un estudio en adultos jóvenes sanos demostrando que el uso recreacional de los inhibidores de PDE₅, sin prescripción médica, se asocia al uso concomitante con alcohol u otras drogas (Bechara et al. 2010).

Por lo tanto, considerando el amplio uso terapéutico de los inhibidores de PDE₅ (desde el tratamiento de la impotencia sexual hasta el tratamiento de afecciones cardiovasculares) y el probable solapamiento de la activación de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc durante el uso concomitante con otras drogas de abuso, resulta relevante farmacológicamente el estudio de las vías activadas durante el desarrollo de sensibilización a cocaína y sus posibles implicancias en el uso concomitante con otros fármacos legales, utilizados en la terapéutica, que activen las mismas vías de señalización. Es por esta razón que, en este trabajo de tesis se utilizó al sildenafil, por una parte como herramienta para inhibir la PDE₅ y potenciar la vía incrementando los niveles de GMPc; y por otro lado, para evaluar la importancia que tiene este fármaco respecto al uso concomitante con cocaína, u otras drogas de abuso, a lo cual se ha hecho referencia anteriormente.

OBJETIVOS



Las neuroadaptaciones que resultan de la exposición crónica a drogas de abuso estarían relacionadas con procesos de aprendizajes asociativos, en los que el hipocampo tiene un rol fundamental. El óxido nítrico participa en el desarrollo de sensibilización conductual a cocaína, sin embargo, muy poco se conoce sobre los mecanismos a través de los cuales dicho neurotransmisor participa en el desarrollo de las neuroadaptaciones producidas por la administración repetida de este psicoestimulante. Hasta el momento, no se encuentran debidamente clarificadas las vías de señalización responsables del desarrollo de sensibilización, ni la participación del hipocampo como estructura moduladora del circuito de recompensa en dicho fenómeno.

Si bien muchos protocolos de administración repetida de cocaína han probado desarrollar sensibilización, este fenómeno ocurre solo en una proporción de los animales expuestos al psicofármaco, no obstante, poco se conoce acerca de los cambios moleculares diferenciales en la proporción de animales que no sensibiliza.

Los antecedentes descritos previamente nos llevan a postular nuestra **HIPÓTESIS**, la cual supone que **tanto el desarrollo como la expresión de la sensibilización conductual a cocaína, y la transmisión hipocampal asociada, serían consecuencia de un aumento en la expresión y funcionalidad de la enzima NOSn y la consecuente activación de la vía NO/GCs/GMPc.**

Es por ello que el **OBJETIVO GENERAL** del presente trabajo es **establecer si los cambios funcionales y neuroquímicos generados por cocaína en el hipocampo son dependientes de óxido nítrico, evaluando la participación de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc.**

Abordamos este estudio desde tres perspectivas distintas, utilizando herramientas conductuales, electrofisiológicas y bioquímicas. Siendo los **objetivos específicos** de esta tesis doctoral:

OBJETIVO 1: Evaluar el rol de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc en el **desarrollo** de la sensibilización conductual a cocaína utilizando herramientas farmacológicas que permitan su activación o inactivación en diferentes puntos de la vía de señalización propuesta.

OBJETIVO 2: Estudiar la dependencia de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc en la transmisión sináptica en el hipocampo, asociada al desarrollo de sensibilización a cocaína, que podría contribuir al proceso patológico de aprendizaje que está relacionado a la adicción.

OBJETIVO 3: Determinar posibles variaciones en la expresión y funcionalidad de la enzima NOS en el hipocampo asociadas a la sensibilización a cocaína.

OBJETIVO 4: Evaluar la importancia de la señalización por óxido nítrico en la **expresión** de la sensibilización conductual a cocaína y en la transmisión sináptica hipocampal asociada a la misma.

Consideramos que los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos implicados en la adicción a la cocaína. Concretamente, este estudio proporciona un conocimiento más profundo de la importancia de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc en la sensibilización a cocaína, como así también enfoca su atención en la diferencias que puedan estar asociadas a una vulnerabilidad particular en cada individuo. Asimismo, el estudio de los cambios neurobiológicos que subyacen a la sensibilización a cocaína es crucial, dado que su prevención o su reversión podrían ser una herramienta fundamental en el tratamiento de la adicción a esta droga, que es el fin último que persiguen los aportes que intenta brindar este trabajo de investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS. GENERALIDADES

1. Sujeto experimental

Se utilizaron ratas Wistar macho de 5 a 6 semanas, edad comparable con el período adolescente en humanos, en la que los sujetos son más vulnerables a una conducta adictiva (Spear 2000; Badanich et al. 2006). Los mismos fueron divididos en grupos al azar y se mantuvieron a una temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad de $55 \pm 5\%$, con un ciclo de 12 h luz/oscuridad (fase de luz 07:00-19:00) y con libre acceso a agua y comida.

Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Cuidado y uso de Animales, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo a los lineamientos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) difundidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH Publicaciones N° 80-23, revisadas en 1996). Los experimentos se realizaron minimizando la cantidad de animales utilizados y su sufrimiento.

2. Drogas

Las drogas utilizadas en este estudio fueron: clorhidrato de cocaína (**COC**, 15 mg/kg), 7-Nitroindazole (**7-NI**, 50 mg/kg), como inhibidor selectivo de NOSn. Citrato de sildenafil (**SIL**, 5 mg/kg), como inhibidor de PDE₅, y 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (**ODQ**, 2 mg/kg) como inhibidor de GC. Dichas drogas fueron adquiridas en Laboratorios *Verardo y Cía*, *Sigma Aldrich*, *Todo Droga* y *Cayman Chemical*, respectivamente. 7-NI y ODQ fueron disueltos en Cremophor EL de Sigma Aldrich, 10% en NaCl al 0,9% como vehículo (VEH), y SIL y COC en NaCl al 0,9%.

3. Test comportamental: Actividad Locomotora

Inmediatamente después de la administración correspondiente, en los días 1 y 5 (**diseño 1**) o en los días 1 y 11 (**diseño 2**), se evaluó la actividad locomotora de los animales de manera automática, mediante un actógrafo, durante los 50 minutos posteriores a la administración, previa habituación de una hora al nuevo contexto (cajas de actógrafo).

Dicho actógrafo consiste en cajas individuales de 30,5 X 19,5 X 46,5 cm, equipadas con dos fotocélulas paralelas entre sí, ubicadas a 3 cm del piso y conectadas a una interface y una computadora que registra la interrupción de un haz de luz entre las fotocélulas debida al movimiento horizontal del animal y lo contabiliza como una cuenta de actividad ("*cuentas horizontales*"). Todos los animales fueron testeados bajo luz fluorescente de 350-400 lux de intensidad.

Se consideró a un animal en condición de **SENSIBILIZADO** cuando se observó un incremento superior al 20% en el último día de inyección (día 5 en el **diseño 1** o día 11 en el **diseño 2**) respecto al primer día en la actividad locomotora. Aquellos animales que no superaron dicho incremento fueron considerados **NO SENSIBILIZADOS**. Este criterio fue adoptado considerando el trabajo de Pierce et al (Pierce et al. 1996) en donde se mostraron alteraciones diferenciales en la liberación de aminoácidos excitatorios después de la exposición repetida a cocaína, según los diferentes patrones de actividad locomotora.

4. Diseño experimental

Diseño 1: El esquema de administración consistió en la administración intraperitoneal (i.p.) de cada uno de los inhibidores por separado, **7-NI**, **SIL**, **ODQ** o **VEH**, y luego de 30 minutos cocaína (**COC**; 15 mg/kg) o salina (**SAL**; 1 mg/kg) una vez al día durante 5 días consecutivos. Por consiguiente los grupos experimentales fueron: **VEH+SAL**; **VEH+COC**; **7-NI+SAL**; **7-NI+COC**; **SIL+SAL**; **SIL+COC**; **ODQ+SAL**; y **ODQ+COC** (Figura 10).

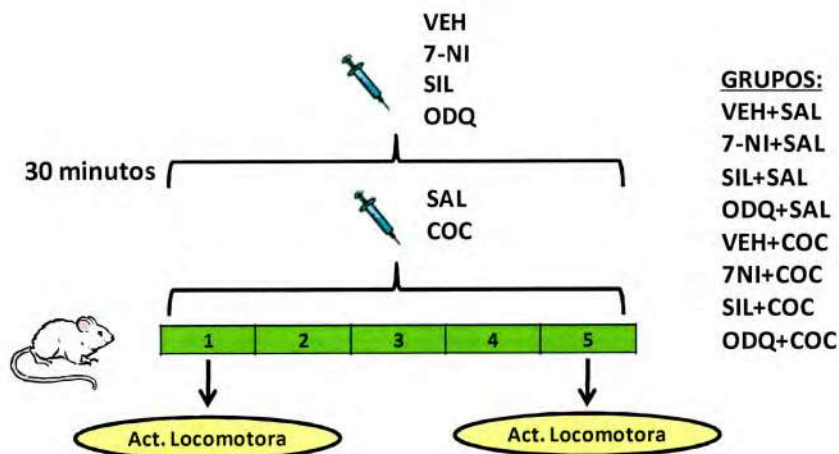


Figura 10: Esquema que muestra el diseño experimental utilizado: **Diseño 1**

Diseño 2: El esquema de administración consistió en la administración i.p. de **SAL** (1 mg/kg) o **COC** (15 mg/kg) durante 5 días (días 1 al 5) y **VEH** o **7-NI** i.p. en los 5 días siguientes (días 6 a 10). En el día 11 se administró por la misma vía una dosis desafío (“challenge”) de **SAL** o **COC** (15 mg/kg), con el fin de expresar la sensibilización al efecto de cocaína sobre la locomoción en los distintos grupos. La actividad locomotora fue medida en los días 1 y 11 del tratamiento. Por consiguiente los grupos experimentales fueron: **SAL/VEH**; **COC/VEH**; **SAL/7-NI** y **COC/7-NI** (Figura 11).

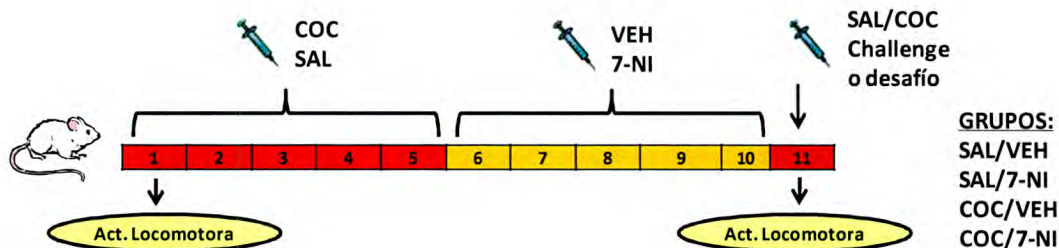
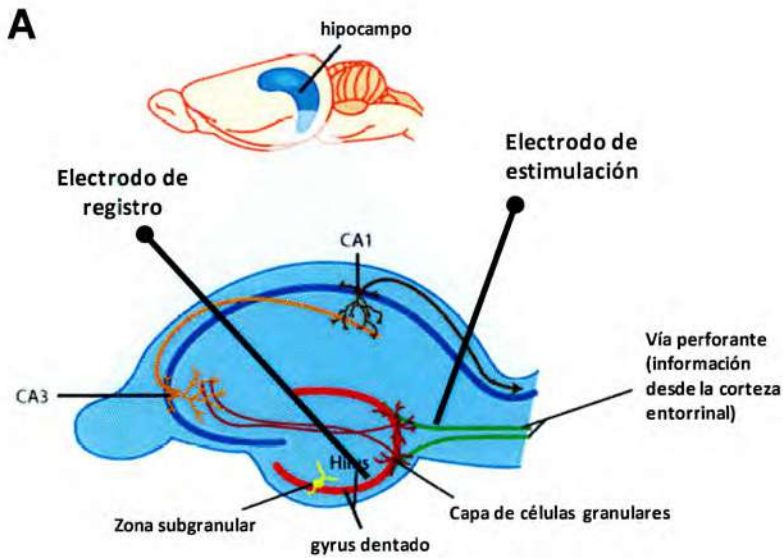


Figura 11: Esquema que muestra el diseño experimental utilizado: **Diseño 2**.

5. Electrofisiología

Se determinó la frecuencia umbral (Hz) para generar la potenciación a largo plazo (LTP -del inglés- Long Term Potentiation) en los distintos grupos experimentales. Los experimentos electrofisiológicos fueron realizados *in vitro* utilizando cortes transversales de hipocampo, en la vía del tracto perforante - gyrus dentado hipocampal (Teyler and DiScenna 1987; Monti et al. 2012). Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la última administración, entre las 10:00 a.m y las 11:00 a.m, para evitar variaciones causadas por el ritmo circadiano o estresores no específicos. Se procedió a extraer el hipocampo y se realizaron cortes transversales de aproximadamente 400 μm de espesor, los cuales fueron mantenidos en condiciones saludables en la cámara de registro (BSC-BU Harvard Apparatus) mediante la perfusión continua con líquido cefalorraquídeo artificial (*aCSF* -del inglés- artificial cerebrospinal fluid) conteniendo NaCl, 124,3 mM; KCl, 4,9 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3 mM; H_2KPO_4 , 1,25 mM; HNaCO_3 , 25,6 mM; glucosa, 10,4 mM; de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,3 mM; saturado con carbógeno (95% de O_2 / 5% de CO_2) y mantenido a una temperatura de 28°C por un controlador de temperatura (TC-202A Harvard Apparatus) durante todo el experimento. Los potenciales de campo postsinápticos excitatorios (fEPSPs -del inglés-

field Excitatory Post Synaptic Potentials) fueron evocados con un electrodo de estimulación colocado en el tracto perforante (PP *-del inglés- perforant pathway*) y conectado a un generador de pulsos (A310 Accupulser-World Precision Instruments Inc., EE.UU.), y el electrodo de registro fue colocado en la capa de células granulares del gyrus dentado, y conectado a un amplificador que envió las señales a un osciloscopio donde se observaron y registraron los fEPSPs generados (Figura 12A). Los fEPSP que respondieron a pulsos de 0,2 Hz (0,5 ms; 10 mA cada uno) fueron medidos cada 5 min durante un período de 20 a 30 min de tiempo (para tomar el registro basal). Sólo los cortes que mostraron una respuesta estable fueron incluidos. Una vez que se observó una señal estable en la amplitud del fEPSP, se aplicó el protocolo de estimulación de frecuencia variable para determinar el umbral para la generación de LTP. El protocolo de estimulación de frecuencia variable consistió en un tren de pulsos de 2 segundos de duración (0,5 ms; 10 mA cada uno), de frecuencia creciente (5-200 Hz), que fue otorgado al PP, por el generador de pulsos. Diez minutos después de cada estímulo, a una determinada frecuencia se realizó un nuevo registro de la señal a 0.2 Hz, y cuando no se observó potenciación en la amplitud de fEPSP, un nuevo estímulo en la siguiente frecuencia fue aplicado. Se considera que el LTP fue generado cuando se produce un aumento en algún parámetro del fEPSP superior al 30% con respecto a los mismos parámetros del fEPSP obtenido previo al estímulo (basal), y que persiste durante 60 min (Figura 12B). Una vez que se generó el LTP, ningún otro estímulo fue otorgado y se continuó registrando el fEPSP a 0,2 Hz para evaluar la persistencia del incremento observado en el fEPSP al menos durante una hora.

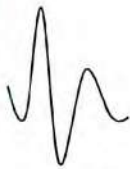
**B**

fEPSP

LTP



Basal



Post-Estímulo

Figura 12:A) Imagen que muestra la ubicación de los electrodos en el corte de hipocampo de cerebro de rata. El electrodo de estimulación se coloca en el tracto perforante y el electrodo de registro en el giro dentado. B) A la izquierda, representación de un fEPSP en estado basal, previo al estímulo. A la derecha, la señal representativa obtenida luego del estímulo, mostrando el incremento respecto a la señal basal que demuestra la potenciación a largo plazo (LTP).

Adicionalmente, para cada grupo experimental una nueva rebanada por animal, y con fEPSP estable tal como se describió, recibió un estímulo de alta frecuencia utilizando el protocolo de estimulación supra-máxima que consiste en 3 trenes de pulsos de 0,5 ms y frecuencia de 100 Hz con una duración de 2 segundos cada uno. Dicho protocolo se utilizó con el objeto de demostrar si un estímulo de alta frecuencia es capaz de generar LTP en todos los grupos experimentales y si existen variaciones en el grado de potenciación de los fEPSP generados entre los distintos grupos experimentales.

6. Test de evitación inhibitoria (step down)

El aparato utilizado para realizar el test de evitación inhibitoria consiste en una caja de 50 x 25 x 25 cm con una plataforma de 2,5 cm de alto y 7 cm de ancho en el lado izquierdo de la caja. La superficie del mismo consta de barras paralelas de acero

inoxidable de 0,1 cm de diámetro separadas por 1 cm de distancia entre sí (Figura 13). En el día de **entrenamiento** cada animal fue colocado en la plataforma registrándose el tiempo de demora para descender de la plataforma colocando las cuatro patas en las barras paralelas. Cuando el animal descendió y pisó las barras paralelas, recibió un shock de 0,36 mA, por 2 segundos en las patas, y se lo retiró de inmediato devolviéndolo a su caja hogar. Veinticuatro horas después de la sesión de entrenamiento se realizó el **test** con el objeto de medir la retención de la memoria en los diferentes grupos de animales. El procedimiento en el día del test fue idéntico a la sesión de entrenamiento, excepto que el animal no recibió shock, y se midió el tiempo que el animal demoró en bajar a la grilla, al que se denominó "tiempo de latencia" (Bernabeu et al. 1995), el cual es utilizado como una medida de retención de la memoria.

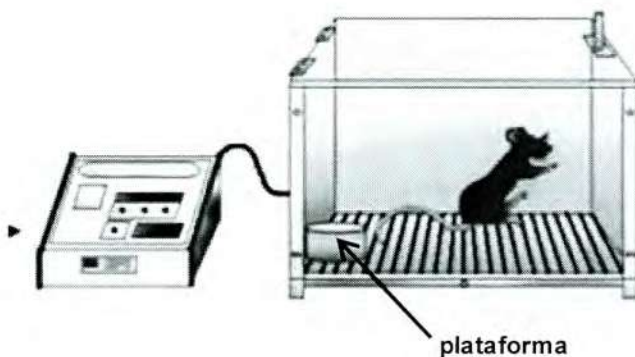


Figura 13: Aparato utilizado para realizar el test de evitación inhibitoria o step down.

7. Neuroquímica

a. *Actividad de la enzima NOS*

La actividad de la enzima se determinó mediante la cuantificación de la conversión de L-[U-¹⁴C]-arginina marcada radioactivamente, en L-[¹⁴C]-citrulina utilizando una modificación del método descrito por Bredt et al (Bredt et al. 1990). Dado que la enzima NOS produce cantidades equimolares de L-[¹⁴C]-citrulina y NO, es posible determinar la actividad de la enzima, la cual se refleja en la cantidad de producto, midiendo la cantidad de L-[¹⁴C]-citrulina formada (Knowles and Salter 1998).

La cantidad de L-[U-¹⁴C]-arginina óptima utilizada para la reacción enzimática fue seleccionada según trabajos previos realizados en el Departamento de Farmacología (Cragnolini et al. 2006). Una vez obtenido el hipocampo, el mismo se colocó en 500 μ l de buffer krebs Ringer, albúmina 0,1 %, Hepes 10 mM, a pH 7,1 e incubado a 37 °C por 8 min, bajo atmósfera de carbógeno (CO₂ 5%/O₂ 95%). Posteriormente el tejido fue homogeneizado y luego incubado en un medio de Hepes 20 mM, ditiotreititol 100 mM, β -NADPH 400 μ M, CaCl₂ 45 mM. Alícuotas de 200 μ l de homogenato se incubaron con 0,1 μ Ci L-[U-¹⁴C]-arginina (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) por 30 min a 37 °C, bajo atmósfera de carbógeno. La reacción se detuvo colocando las muestras a 0-4 °C. El homogenato fue centrifugado a 10000 rpm y 4°C por 10 min y el sobrenadante trasladado a una columna conteniendo Dowex AG 50-X8, previamente estabilizada con Hepes 20mM (pH 7,4) con el objeto de separar la L-[¹⁴C]-citrulina del sobrenadante, donde luego se eluyó con 3 ml de agua destilada. La L-[¹⁴C]-citrulina formada se cuantificó mediante espectroscopía de centelleo líquido. Los datos se expresaron como niveles de NO (picomoles L-[¹⁴C]-citrulina formada) por miligramo de proteína (pmol NO/mg prot). La cuantificación de proteínas fue determinada por el método de Lowry (Lowry et al. 1951).

b. Inmunohistoquímica de NOSn

Luego del tratamiento correspondiente, los animales fueron anestesiados y perfundidos transcardíacamente con una solución de salina/heparina (NaCl 0,9%/1000 unidades/L) y luego paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PB) 0,1M, pH 7,4. Los cerebros fueron removidos, fijados en la solución de paraformaldehído al 4% durante 12hs a 4°C, y luego trasvasados a una solución de sucrosa al 30% en PB por 72 hs a 4°C. Se realizaron secciones coronales de 40 μ m de espesor, utilizando un crióstato (Leica CM1510S), obteniéndose cortes correspondientes a hipocampo dorsal utilizando como guía histológica el atlas "The Rat Brain" (Paxinos et al. 1985), y como control de estructura se utilizó la corteza motora. Posteriormente, los cortes fueron incubados en una solución de 10% metanol, 3% peróxido de hidrógeno en PB por 1 h en agitación para eliminar la actividad de peroxidasa endógena y luego incubados por 1 h en agitación en una solución de bloqueo inespecífico (5% albúmina sérica bovina, BSA) y 0,3% tritón X-100 en PBS 0,1M). A continuación, los cortes fueron incubados durante

48 hs a 4°C y en agitación constante con un anticuerpo policlonal NOSn de conejo (Cell Signaling Technology) en una dilución 1:500 en PBS 0,1M, conteniendo 1% BSA y 0,1% de tritón X-100. Luego, los cortes fueron lavados e incubados por 2 horas en agitación con anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, dilución 1:800 en 0,1 M PBS), seguido por la incubación con el complejo avidina–biotina–peroxidasa (Vector ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Como cromógeno se utilizó diamino-benzidina (DAB, Sigma Aldrich) por 4 a 5 minutos en una solución conteniendo 0,05% DAB y 0,0006% de peróxido de hidrógeno en PB. De este modo el producto final desarrolló un color marrón. Una vez finalizado el revelado se realizaron lavados con PB 0,1 M. Las secciones fueron posteriormente montadas en portaobjetos con una solución de gelatina de (1,5% gelatina, 80% alcohol) y una vez secos cubiertos con líquido de montaje (DPX, Fluka) y cubreobjetos para su visualización.

Cuantificación de células positivas para NOSn

Las células positivas para NOSn fueron identificadas y fotografiadas usando microscopio de campo claro (Leica DM 4000B, Cambridge, UK) con cámara montada (Leica DFC 300 FX) y el programa computacional IM50 (Leica) con una magnificación de 20X. Se seleccionaron cuatro campos visuales de cada área del hipocampo (correspondientes a gyrus dentado, CA1 y CA3) por cada cerebro de rata y se promediaron estos cuatro valores constituyendo un N=1. Entre 4 y 5 animales fueron cuantificados por condición. El recuento de células positivas para NOSn, se realizó a doble ciego, utilizando el programa IMAGE J (Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, NIH).

c. Expresión de NOSn por Western Blot

Esta técnica se utilizó para identificar niveles de proteína NOSn en base a su capacidad para unirse a su anticuerpo específico. Los animales fueron sacrificados para la disección del hipocampo que luego fue homogeneizado en 500 µl de buffer RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón-X100 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, dodecilsulfato de sodio (SDS) 0,1%, pH 7,5) conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa (cocktail de inhibidores de proteasas Halt (Thermo Cientific), EDTA, NaF 10 mM,

ortovanadato de sodio 1 mM, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM). Los homogenatos fueron centrifugados a 12000g durante 10 min a 4°C, obteniéndose el sobrenadante. Alícuotas de dichos sobrenadantes fueron utilizadas para realizar la cuantificación de proteínas utilizando la técnica de Bradford (Bio-Rad Bradford Protein Assay). El sobrenadante restante fue combinado con la misma cantidad de buffer Laemmli (SDS 2%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,01%, Tris 125 mM), llevado a ebullición por 5 min y almacenado a -20°C hasta su uso. Posteriormente las muestras se sembraron en un gel al 7,5% SDS-PAGE y luego se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, BioRAD). Las membranas fueron bloqueadas durante 1h a temperatura ambiente con leche descremada al 5% disuelta en T-TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 0,1%) y posteriormente incubadas durante toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal NOSn de conejo (Cell Signaling Technology) diluído en proporción 1:500 en solución de leche descremada al 5% en T-TBS. Posteriormente las membranas fueron lavadas con T-TBS e incubadas con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) diluído 1:2500 en solución de leche descremada al 2% en T-TBS, durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalizada dicha incubación, las membranas fueron lavadas y luego reveladas por quimioluminiscencia con ECL (*-del inglés-enhanced chemiluminescence*) conteniendo luminol, ácido cumárico como catalizador y peróxido de hidrógeno como sustrato de reacción. Dicho revelado se plasmó en placas radiográficas. Como control de siembra se utilizó anticuerpo primario de cabra para revelar β -actina, procediéndose de igual manera pero siendo incubado en albúmina 5% en T-TBS (dilución 1:1000) y posteriormente utilizando anticuerpo secundario anti-cabra en la misma solución (dilución 1:2000). Los resultados obtenidos en las placas de revelado se escanearon y analizaron con el programa GelPro32 Analyzer. La cuantificación de la señal mediante este programa consistió en medir la densidad óptica del área bajo la curva de cada muestra dividida por el promedio de la señal total de cada placa con el fin de minimizar las diferencias entre los distintos revelados. Los valores obtenidos en cada muestra para NOSn se expresaron en relación a la expresión de β -actina como densidad óptica de NOSn/ β -actina.

8. Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software STATISTICA 8.0. Se utilizó el test de Análisis de Varianza (ANOVA, *-del inglés- ANalysis Of VAriance*) de medidas repetidas para la actividad locomotora, ANOVA de dos vías para el análisis de los resultados electrofisiológicos y de una vía para los resultados de inmunohistoquímica y western blot. En todos los casos se recurrió a Student-Newman-Keuls (SNK) como test a posteriori. Para el análisis de asociación entre el tratamiento recibido por cada grupo y la condición (sensibilizado o no sensibilizado) se utilizó el test múltiple 2x2 Chi-Cuadrado. Para las determinaciones de actividad de NOS se recurrió a ANOVA de dos vías y Least Significant Difference (LSD) como test a posteriori. La correlación de Pearson fue utilizada para analizar la correlación entre la actividad locomotora y los niveles de NO. Los datos comportamentales correspondientes al test de evitación inhibitoria fueron analizados utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney debido a que las variables analizadas no siguen una distribución normal y su varianza no cumple el supuesto de homocedasticidad. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS



1. Impacto de diferentes potenciadores o inhibidores de la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc en el desarrollo de sensibilización conductual a cocaína.

ANTECEDENTES

Las neuroadaptaciones que se producen en el cerebro de individuos adictos podrían ser la base de los fenómenos comportamentales que caracterizan a la conducta adictiva. Dentro de estos procesos complejos, se observa el fenómeno de sensibilización al efecto locomotor, definido como el aumento en la actividad locomotora luego de la administración repetida de la droga. Dicho modelo ha sido ampliamente validado para explicar el craving o la búsqueda de la droga como conducta adictiva (Segal et al. 1981; Robinson and Becker 1986; Post et al. 1988; Kalivas and Stewart 1991). Dado que la sensibilización es un fenómeno que permanece por muchos años, incluso a pesar de períodos prolongados de abstinencia, este modelo se ha utilizado como paradigma de las neuroadaptaciones inducidas por la exposición crónica a drogas y por tanto, como elemento fenotípico de la adicción. También se ha visto que la sensibilización puede asociarse a un contexto (locomoción condicionada), es decir, la inducción de respuestas contextuales asociadas a la administración de cocaína y que se manifiestan como un incremento en la actividad locomotora del animal al ubicarlo en un espacio/ambiente relacionado a la administración de la droga (Itzhak et al. 1998).

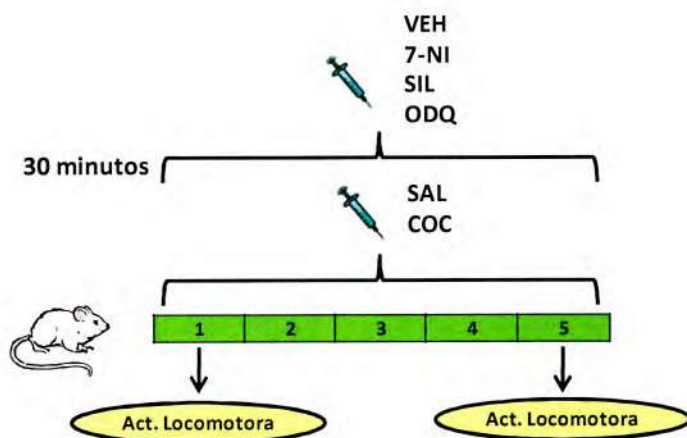
Ha sido demostrado que posteriormente a la administración crónica de cocaína, sólo una parte de los animales expuestos a dicha droga sensibilizan (Pierce et al. 1996; Churchill et al. 1999; Boudreau and Wolf 2005), y esto ha sido asociado con alteraciones diferenciales en la liberación de dopamina y glutamato (Kalivas and Stewart 1991; Pierce et al. 1996). Además se conoce que la neurotransmisión glutamatérgica en el NAc modula la liberación de dopamina (Wu et al. 1993) y está relacionada con la hiperlocomoción y con el comportamiento de búsqueda inducido por cocaína (Pulvirenti et al. 1992). Estos descubrimientos sugieren que la interacción glutamato-dopamina está implicada en el desarrollo de la sensibilización comportamental y en las propiedades de refuerzo de la cocaína (Yamaguchi et al. 2002).

Por otra parte, se sabe que el NO juega un papel importante en la iniciación y el mantenimiento de los efectos comportamentales de drogas psicoestimulantes (Kim and Park 1995; Itzhak 1996). De hecho, el bloqueo farmacológico (por medio de inhibidores de la enzima) o genético (mediante ratones knockout) de NOSn atenúa el desarrollo de sensibilización, el condicionamiento de preferencia al lugar y la autoadministración de psicoestimulantes (Itzhak et al. 1998; Orsini et al. 2002; Itzhak et al. 2010).

En base a estos antecedentes y con el objeto de estudiar el impacto de la activación/inactivación de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc en el desarrollo de sensibilización a cocaína, se utilizaron distintas estrategias farmacológicas que permitieron activar (inhibiendo la metabolización del GMPc) o inactivar la vía (inhibiendo la enzima NOSn o GC con inhibidores específicos).

PROCEDIMIENTO

Los animales recibieron una inyección i.p. de cada uno de los distintos inhibidores (Figura 14), 7-NI, ODQ, SIL o VEH, y luego de 30 minutos COC o SAL, cada día durante 5 días consecutivos. En el primer y quinto día los animales fueron evaluados conductualmente utilizando un test que permite medir la actividad locomotora. La medición de este parámetro permitió discriminar a los animales en la condición de *sensibilizado* y *no sensibilizado* según el criterio del 20% de incremento de la actividad locomotora previamente descripto.



Diseño Experimental 1

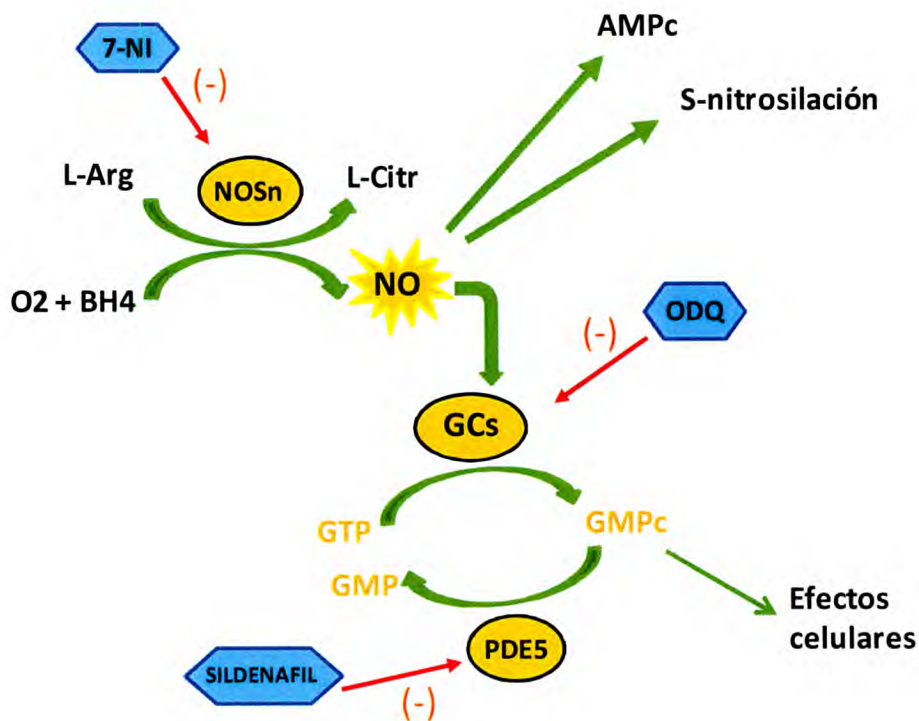


Figura 14: Esquema de la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc que muestra los distintos inhibidores utilizados experimentalmente

RESULTADOS

Se sabe que la administración repetida de cocaína genera sensibilización y que ello ocurre en una proporción de los animales tratados (Pierce et al. 1996; Boudreau and Wolf 2005). Nuestros resultados muestran que la administración repetida de cocaína induce sensibilización evidenciando un aumento significativo en la actividad locomotora en el día 5 comparativamente al día 1, cuando se analizó el total de individuos del grupo que recibió VEH+COC en comparación con el grupo VEH+SAL [$F_{(1,85)}=5,40$; $p<0,05$; post hoc SNK $^{\#}p<0,05$ en comparación con el día 1; $*p<0,05$ en comparación con VEH+SAL] (Figura 15A).

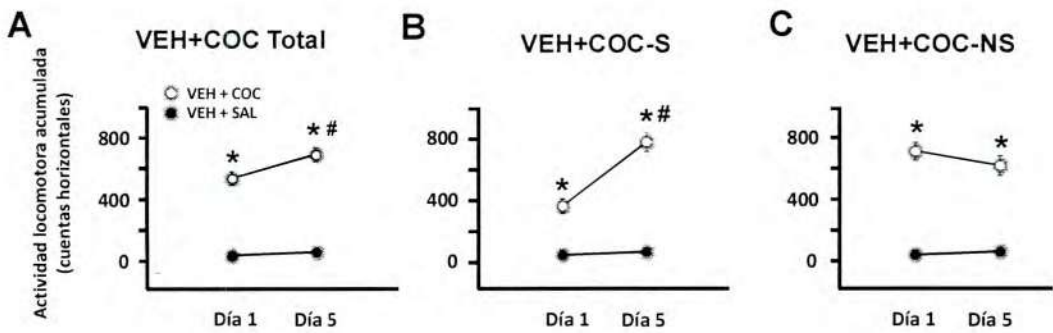


Figura 15: Resultados comportamentales mostrando la actividad locomotora acumulada (50 min) en los días 1 y 5 para: **A)** el grupo total de animales tratados con VEH+COC ($n=51$) y VEH+SAL ($n=18$); **B)** animales que sensibilizaron a la administración repetida con VEH+COC ($n=25$), y **C)** animales que no sensibilizaron a la administración repetida con VEH+COC ($n=26$); # $p<0,05$ comparado con día 1; * $p<0,05$ comparado con VEH+SAL. Los círculos representan las medias \pm SE

Cuando los animales tratados con VEH+COC fueron analizados diferencialmente, teniendo en cuenta el criterio de sensibilización (es decir, si mostraron un incremento superior al 20% en la actividad locomotora del día 5 comparado con el día 1), se observó que 49,02% de los animales cumplieron dicho criterio (grupo sensibilizados, VEH+COC-S; Tabla 1). La actividad locomotora en el día 5 fue significativamente mayor en comparación con el día 1, cuando el grupo VEH+COC-S se comparó con el grupo VEH+SAL [$F_{(1,59)}=92,26$; $p<0,001$; post hoc SNK # $p<0,05$ en comparación con el día 1; * $p<0,05$ en comparación con VEH+SAL] (Figura 15B). Los animales que no cumplieron el criterio fueron considerados como no sensibilizados (50,98%, VEH+COC-NS; Tabla 1). En este grupo, no se encontraron diferencias significativas en la actividad locomotora en el día 5 comparado al día 1 [$F_{(1,60)}=3,63$; $p>0,05$], pero sí un aumento significativo en la actividad locomotora del grupo VEH+COC-NS comparado con VEH+SAL [$F_{(1,60)}=163,05$; $p<0,05$; post hoc SNK * $p<0,05$] (Figura 15C), esto último pone de manifiesto el efecto de cocaína sobre la actividad locomotora, pero no sobre la sensibilización.

Se ha demostrado que la administración del inhibidor selectivo de NOSn (7-NI) bloquea el desarrollo de sensibilización conductual cuando es suministrado previo a la administración de cocaína (Itzhak 1996; Haracz et al. 1997). De la misma manera, en este trabajo se observó que la administración de 7-NI 30 min antes de la administración de cocaína impidió el desarrollo de sensibilización, ya que no se

evidenciaron cambios en la actividad locomotora en el día 5 comparado al día 1 [$F_{(1,73)}=1,09$; $p>0,05$]. Si bien, no se observó sensibilización, los resultados arrojaron un incremento significativo de la actividad locomotora en el grupo total de 7-NI+COC para ambos días comparado con el grupo 7-NI+SAL [$F_{(1,73)}=22,74$; $p<0,001$; post hoc SNK $^*p<0,05$], lo que indica un efecto modesto de cocaína en la locomoción a pesar de la presencia del inhibidor de NOSn (Figura 16A).

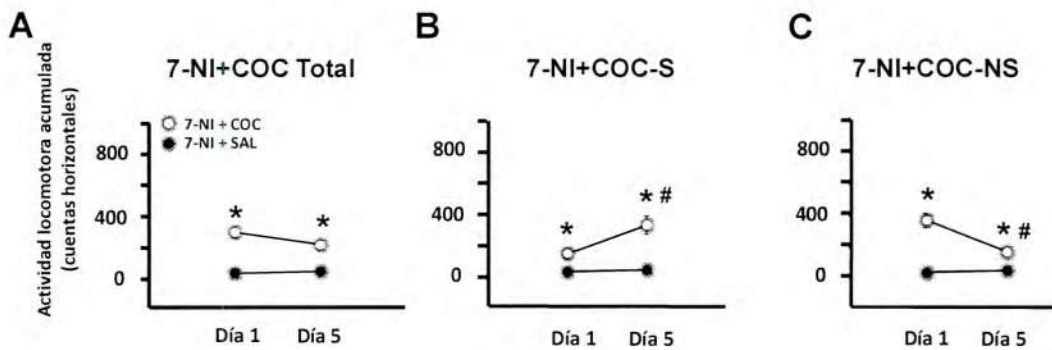


Figura 16: Resultados comportamentales mostrando la actividad locomotora acumulada (50 min) en los días 1 y 5 para: **A)** el grupo total de animales tratados con 7-NI+COC ($n=58$) y 7-NI+SAL ($n=18$); **B)** animales que sensibilizaron a la administración repetida con 7-NI+COC ($n=18$), y **C)** animales que no sensibilizaron a la administración repetida con 7-NI+COC ($n=40$); $^{\#}p<0,05$ comparado con día 1; $*p<0,05$ comparado con 7-NI+SAL. Los círculos representan las medias \pm SE.

A pesar de que ciertos trabajos citados anteriormente, muestran el bloqueo del desarrollo de sensibilización con dicho tratamiento, en nuestra investigación analizamos diferencialmente a los animales tratados con 7-NI+COC y descubrimos un grupo de animales que sensibiliza a pesar de haber recibido el inhibidor de NOSn. En este grupo experimental también se analizó el impacto de la administración de 7-NI previa a cocaína en el desarrollo de sensibilización considerando el criterio de 20% de incremento en la actividad locomotora, y por lo tanto, definimos un grupo de animales sensibilizados (7-NI+COC-S) y otro grupo no sensibilizados (7-NI+COC-NS). La figura 16B muestra un aumento significativo en la actividad locomotora en el día 5 en comparación con el día 1 en el grupo 7-NI+COC-S comparado con el grupo 7-NI+SAL [$F_{(1,33)}=22,73$; $p>0,001$; post hoc SNK $^{\#}p<0,05$ en comparación con el día 1; $*p<0,05$ en comparación con 7NI+SAL]. La figura 16C muestra una disminución significativa de la actividad locomotora en el día 5 en comparación con el día 1 del grupo 7-NI+COC-NS [$F_{(1,55)}=11,35$; $p<0,05$; post hoc SNK $^{\#}p<0,05$]. Curiosamente, con el tratamiento de 7-

NI+COC, sólo el 31,04% de los animales sensibilizaron. La prueba de chi-cuadrado reveló una asociación entre el tratamiento otorgado a los animales (VEH+COC o 7-NI+COC) y el número de ratas en cada condición (sensibilizado y sensibilizados) [$\chi^2_{(0,95)}=3,67$; gl = 1; Tabla 1].

Por otra parte, se evaluó si la **reducción de la disponibilidad de GMPc** podría bloquear o al menos disminuir la sensibilización. Para ello utilizamos ODQ, un inhibidor competitivo de GCs, selectivo e irreversible. Los resultados obtenidos muestran que la administración de ODQ 30 min antes de cocaína impide la sensibilización, mostrando que no hay cambios en la actividad locomotora en el día 5 respecto al día 1 [$F_{(1,26)}=0,42$; $p>0,05$]. Sin embargo, se observó un aumento significativo en la actividad locomotora del grupo ODQ+COC total en comparación con el grupo ODQ+SAL [$F_{(1,26)}=113,4$; $p<0,001$; post hoc SNK * $p<0,05$] (Figura 17A) lo cual denota el efecto propio de cocaína. Una vez más, se detectaron dos grupos de animales, sensibilizados (ODQ+COC-S) y no sensibilizados (ODQ+COC-NS).

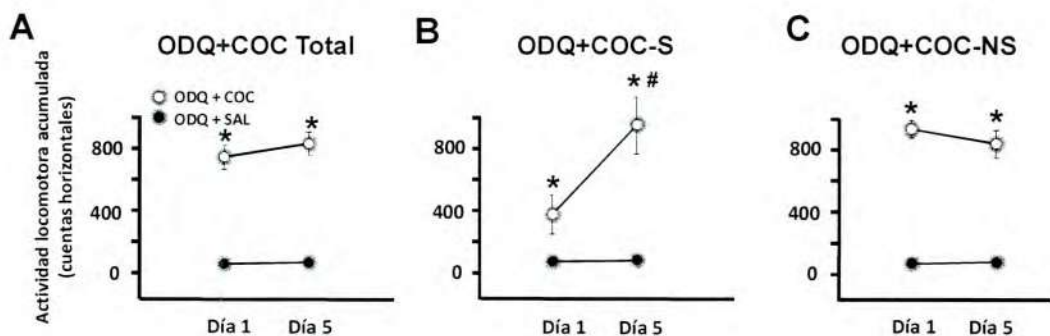


Figura 17: Resultados comportamentales mostrando la actividad locomotora acumulada (50 min) en los días 1 y 5 para: **A)** el grupo total de animales tratados con ODQ+COC ($n=18$) y ODQ+SAL ($n=10$). **B)** animales que sensibilizaron a la administración repetida con ODQ+COC ($n=5$), y **C)** animales que no sensibilizaron a la administración repetida con ODQ+COC ($n=13$); # $p<0,05$ comparado con día 1; * $p<0,05$ comparado con ODQ+SAL. Los círculos representan las medias \pm SE.

La figura 17B muestra un aumento significativo de la actividad locomotora en el día 5 respecto al día 1 cuando el grupo ODQ+COC-S se comparó con ODQ+SAL [$F_{(1,13)}=22,51$; $p<0,001$; post hoc SNK # $p<0,05$ comparado con día 1; * $p<0,05$ comparado con ODQ+SAL]. La figura 17C muestra que no hay diferencias en la actividad locomotora en el día 5 respecto al día 1 en el grupo ODQ+COC-NS [$F_{(1,21)}=0,46$; $p>0,05$]. Tal como se predijo, con el tratamiento ODQ+COC, sólo un

27,78% de los animales mostró sensibilización. La prueba de chi-cuadrado reveló que el número de animales en cada condición (sensibilizados y no sensibilizados) depende del tratamiento recibido (VEH+COC u ODQ+COC) y [$\chi^2_{(0,95)}=2,44$; $g_l = 1$; Tabla 1].

Por último, para probar si la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc contribuye a la sensibilización a cocaína, se **inhibió la hidrólisis de GMPc** mediante la utilización de sildenafil (SIL), un inhibidor potente y selectivo de PDE₅. Los resultados obtenidos indican que la administración de SIL 30 min antes de cocaína produce sensibilización, lo cual se observa como un aumento significativo en la actividad locomotora en el día 5 respecto al día 1, cuando el grupo SIL+COC total fue comparado con el grupo SIL+SAL [$F_{(1,61)}=5,24$; $p<0,05$; post hoc SNK [#] $p<0,05$ comparado con el día 1; * $p<0,05$ comparado con SIL+SAL] (Figura 18A). Bajo estas condiciones, también se reveló el grupo de animales sensibilizados (SIL+COC-S) y el grupo no sensibilizados (SIL+COC-NS).

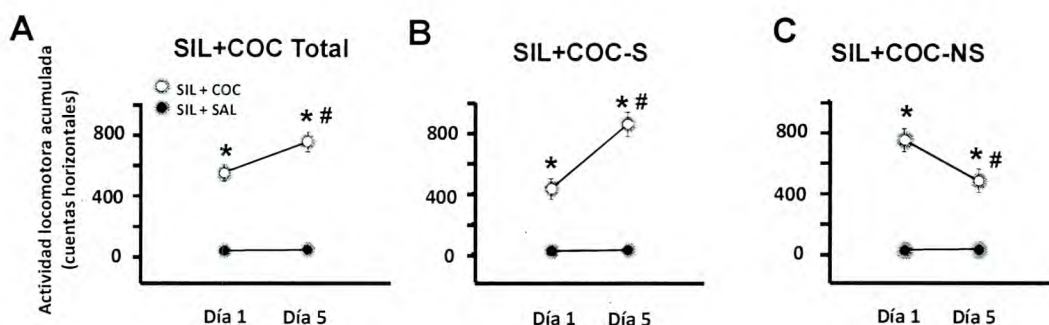


Figura 18: Resultados comportamentales muestran la actividad locomotora acumulada (50 min) en los días 1 y 5 para: **A)** el grupo total de animales tratados con SIL+COC ($n=43$) y SIL+SAL ($n=20$); **B)** animales que sensibilizaron a la administración repetida con SIL+COC ($n=29$), y **C)** animales que no sensibilizaron a la administración repetida con SIL+COC ($n=14$); * $p<0,05$ comparado con día 1; * $p<0,05$ comparado con SIL+SAL. Los círculos representan las medias \pm SE.

La figura 18B mostró un aumento significativo en la actividad locomotora en el día 5 respecto al día 1 en el grupo SIL+COC-S y cuando el grupo SIL+COC-S se comparó con el grupo SIL+SAL [$F_{(1,47)}=103,09$; $p<0,05$; post hoc SNK [#] $p<0,05$ comparado con día 1; * $p<0,05$ comparado con SIL+SAL]. La figura 18C mostró una disminución significativa en la actividad locomotora en el día 5 en comparación con día 1 en el grupo SIL+COC-NS [$F_{(1,32)}=19,07$; $p<0,05$; post hoc SNK [#] $p<0,05$]. Sorprendentemente, bajo este tratamiento, el 67,44% de los animales mostraron sensibilización. La prueba de chi-

cuadrado reveló una asociación entre el tratamiento recibido por los animales (VEH+COC o SIL+COC) y el número de ratas en ambas condiciones (sensibilizados y no sensibilizados) [$\chi^2_{(0,95)} = 3,24$; $gl = 1$; Tabla 1].

Tratamiento	%Sensibilizados	% No Sensibilizados
VEH + COC	49,02	50,98
7-NI + COC	31,04*	68,96
ODQ + COC	27,78*	72,22
SIL + COC	67,44*	32,56

TABLA 1: Distribución de animales sensibilizados y no sensibilizados expuestos a distintos tratamientos. *Distinto de VEH+COC, Test 2x2 Chi-cuadrado múltiple.

CONCLUSIÓN

Estos resultados indican que cocaína produce sensibilización en una proporción de los animales tratados, próxima al 50%. La inhibición de la enzima NOS y de GC es capaz de atenuar el desarrollo de sensibilización conductual reduciendo el porcentaje de animales que sensibilizan luego del tratamiento repetido con cocaína. De manera opuesta, el aumento de la disponibilidad de GMPc, mediante el bloqueo de su degradación (con un inhibidor de PDE₅, SIL), favorece la sensibilización, ya que el porcentaje de animales sensibilizados se ve incrementado. Estos resultados sugieren la participación de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc en el desarrollo de la sensibilización conductual a cocaína.

Por otra parte, el aumento obtenido en el porcentaje de sujetos tratados con SIL+COC nos permiten señalar que los inhibidores de PDE₅ aumentarían la vulnerabilidad a la adicción a cocaína en roedores, activando las mismas vías de señalización cerebrales que utiliza cocaína y de esta manera podemos suponer que la estimulación sostenida de la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc contribuiría al desarrollo de adicción futura o podría exacerbar la misma en pacientes adictos, siendo los inhibidores de PDE₅ candidatos para estas acciones ya que incrementarían la vulnerabilidad al abuso de drogas cuando se utilizan de manera concomitante.

2. Participación de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc en la transmisión sináptica en el hipocampo, durante la sensibilización a cocaína, y su contribución al proceso patológico de aprendizaje asociado a la adicción.

ANTECEDENTES

Se ha demostrado que la exposición repetida a cocaína conduce a cambios plásticos en el cerebro que contribuyen a la manifestación de comportamientos adictivos. Aunque la atención se ha centrado mayormente en la vía meso-cortico-límbica, numerosos estudios han demostrado que el hipocampo juega un papel crítico en el fenómeno de la adicción, ya que participa en los procesos complejos de aprendizaje que contribuyen a los comportamientos de búsqueda compulsiva de las drogas y en la recaída en sujetos adictos. Además se ha visto que los aumentos sostenidos de monoaminas en el espacio sináptico, que resultan de la exposición repetida a cocaína y de otros psicoestimulantes, pueden influir tanto en los mecanismos que subyacen al fenómeno de LTP en el hipocampo, y en otras áreas del cerebro (Thomas and Malenka 2003; Wolf 2003; Li and Kauer 2004), como en la remodelación en la membrana post-sináptica y la estructura anatómica de las espinas dendríticas (Shen et al. 2009). También ha sido descrito que distintos tratamientos crónicos con cocaína son capaces de producir un efecto modulador de la plasticidad sináptica en el área CA1 del hipocampo (Thompson et al. 2004; del Olmo et al. 2006).

Existen estudios que demuestran que la excitabilidad neuronal y la plasticidad sináptica son moduladas por el NO durante el tratamiento repetido con psico fármacos en diferentes estructuras cerebrales, como el hipocampo (Schuman and Madison 1991; Haley et al. 1992; Prast and Philippu 2001) y la corteza pre-frontal medial. En esta última estructura, la inhibición de NOSn durante la administración repetida de cocaína impide el aumento persistente de la excitabilidad de membrana en neuronas piramidales observado después de un período corto de abstinencia a cocaína (Nasif et al. 2011). Además, es ampliamente conocido el hecho que el NO funciona como segundo mensajero regulando la liberación de varios neurotransmisores como dopamina y glutamato (Schulman 1997).

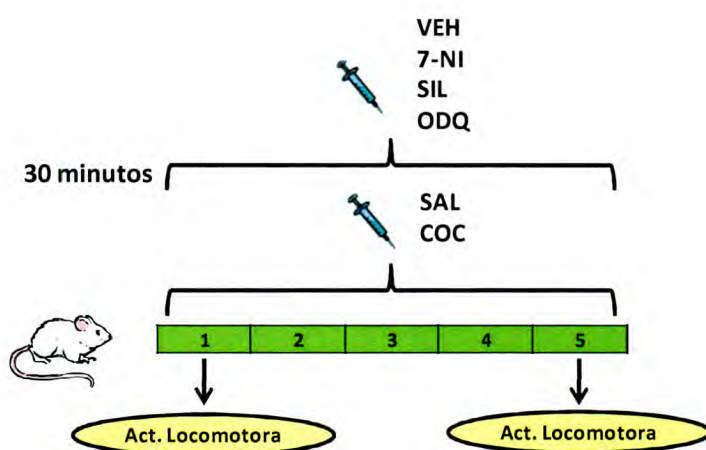
Tal como se ha expresado anteriormente, muchas de las adaptaciones moleculares y celulares involucradas en la adicción también se han observado en modelos de aprendizaje y memoria. Adicionalmente, las vías glutamatérgicas que se originan en hipocampo parecen estar específicamente involucradas en los aspectos motivacionales de la adicción a drogas, ya que son importantes para una recaída luego de períodos de discontinuación de las mismas. Sin embargo, los efectos de cocaína sobre el aprendizaje y la memoria han sido estudiados en una variedad de paradigmas, con resultados opuestos. Algunos estudios han comprobado que cocaína produce déficits de memoria y aprendizaje (Melnick et al. 2001; Quirk et al. 2001; Santucci et al. 2004), en concordancia con aquellos que muestran que cocaína induce deterioros en la LTP (Smith et al. 1993; Mackowiak et al. 2008). Por otra parte, se ha demostrado que la auto-administración de cocaína es capaz de producir facilitación de la memoria y el aprendizaje en el desempeño de roedores expuestos al laberinto acuático (morris water maze) frente a tareas de alta exigencia (Del Olmo et al. 2007). Otros estudios han informado que una sola exposición a cocaína inmediatamente después del entrenamiento en el paradigma de evitación inhibitoria, mejora la retención de la memoria en ratones (Introini-Collison and McGaugh 1989).

Por lo tanto, teniendo en cuenta por un lado la importancia del hipocampo tanto en los procesos de aprendizaje y memoria, como en la adicción a drogas y los mecanismos neurobiológicos comunes entre ambos procesos, y por otra parte, los antecedentes acerca de la participación del NO en la plasticidad sináptica y la sensibilización a cocaína, planteamos el segundo objetivo para evaluar la contribución de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc en los cambios plásticos que ocurren en el hipocampo durante la sensibilización a cocaína, y su importancia en el proceso patológico de aprendizaje que está asociado a la adicción.

PROCEDIMIENTO

Se determinó si existen diferencias en la facilitación para generar LTP en hipocampo en los distintos grupos tratados. Veinticuatro horas después de la medición de la actividad locomotora en el día 5, (según **Diseño 1**) los animales fueron sacrificados y se midió el umbral para generar LTP en cada uno de los grupos

experimentales descritos en la **Parte 1** de este trabajo. Para ello se utilizó una técnica electrofisiológica de registro extracelular multiunitario en cortes transversales de hipocampo. Por otra parte, para evaluar si los cambios producidos en la generación del LTP se correlacionan con efectos facilitatorios o inhibitorios en la formación de una memoria que depende de la participación del hipocampo, se estudió la retención de la memoria por medio del test comportamental conocido como evitación inhibitoria o *step down* en los grupos VEH+SAL y VEH+COC. Luego del quinto día de administración los animales fueron sometidos al entrenamiento recibiendo un shock eléctrico en las patas y 24 horas después se realizó el test para comprobar la retención en la memoria (Ver Sección **Materiales y Métodos: Generalidades**).



Diseño Experimental 1

RESULTADOS

2.1. Efecto de diferentes potenciadores o inhibidores de la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc en la transmisión sináptica en el hipocampo.

Se observó una facilitación de la transmisión sináptica hipocampal en el grupo de animales que recibieron el tratamiento con VEH+COC, observado como una disminución en el umbral para generar LTP respecto a su control VEH+SAL [$F_{(1,14)}=51,20$; $p<0,001$; post hoc SNK $*p<0,05$](Figura 19A). Resulta interesante el hecho de que, cuando los animales fueron discriminados en su condición

sensibilizados y no sensibilizados se observó una disminución en el umbral aún mayor en el grupo VEH+COC-S [$F_{(2,13)}=38,06$; $p<0,001$; post hoc SNK $*p<0,05$] (Figura 19B)

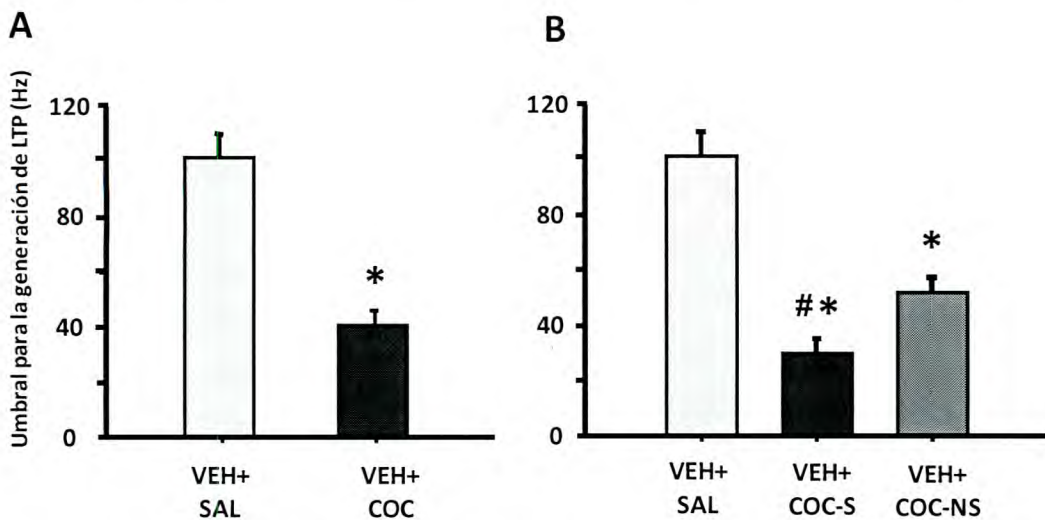


Figura 19: A) Umbral para la generación de LTP en animales VEH+SAL (n=6) y VEH+COC (n=10). B) Umbral para la generación de LTP en animales VEH+SAL (n=6), comparado con aquellos que sensibilizaron (VEH+COC-S, n=5) y que no sensibilizaron (VEH+COC-NS, n=5). $*p<0,05$ comparado con VEH+SAL. Las barras representan las medias \pm SE.

Posteriormente a cada medición, se observó la evolución temporal de los incrementos en los fEPSP, como porcentajes del fEPSP basal, después de otorgar un estímulo utilizando el protocolo de estimulación supra-máxima (ver **Materiales y Métodos. Generalidades**) a una nueva rebanada de hipocampo, que es capaz de generar LTP en los grupos experimentales VEH+SAL, VEH+COC-S y VEH+COC-NS. De esta manera se observó que la LTP fue generada en todos los grupos experimentales con incrementos en la fEPSP por encima del 30%. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de aumento de los fEPSP entre los grupos a lo largo de los tiempos medidos [$F_{(6, 30)}= 0,72$; $p>0,05$] (Figura 20)

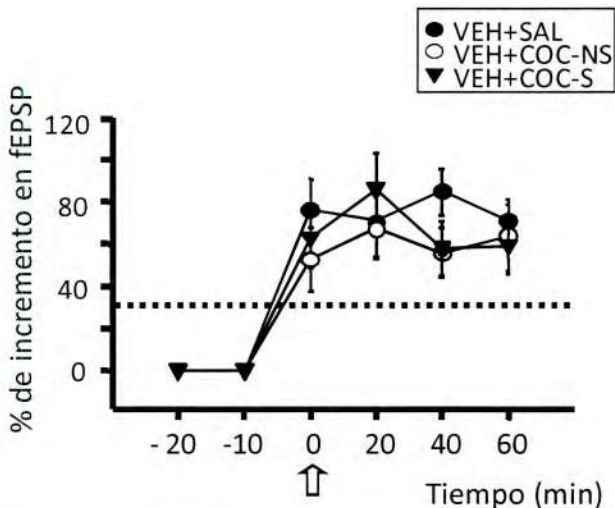


Figura 20: Porcentaje de incrementos en fEPSP, después de un estímulo de alta frecuencia (100 Hz), que es capaz de generar LTP en los grupos VEH+SAL (n=8), VEH+COC-S (n=7) y VEH+COC-NS (n=7). La flecha indica el momento en que fue otorgado el estímulo.

Cuando se inactivó la producción de NO utilizando 7-NI, 30 minutos antes de cada administración diaria de cocaína (7-NI+COC), se observó un aumento significativo del umbral para generar la LTP cuando se comparó con el grupo VEH+COC [$F_{(1,26)}=8,38$; $p<0,01$; post hoc SNK $*p<0,05$] (Figura 21B), revirtiendo de manera parcial la facilitación observada en el grupo VEH+COC.

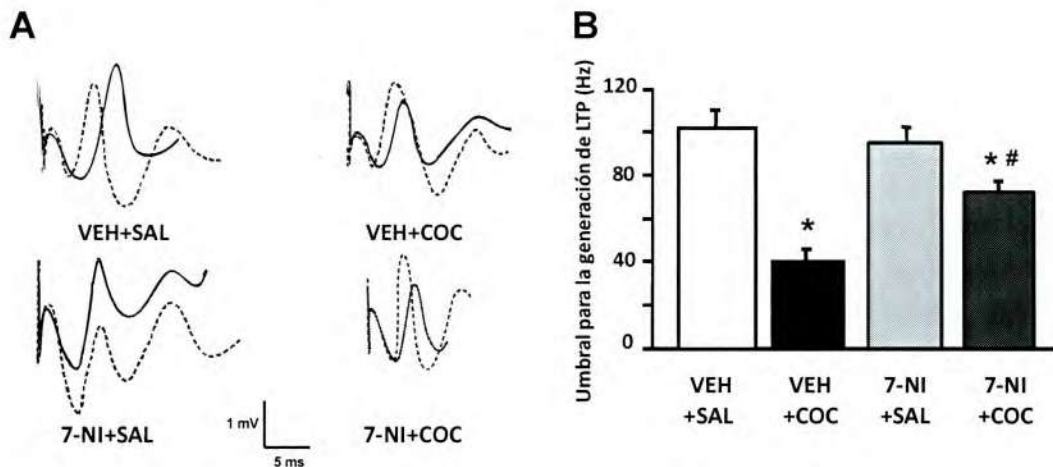


Figura 21: A) Trazos representativos de fEPSP correspondientes a los grupos VEH+SAL, VEH+COC, 7-NI+SAL, y 7-NI+COC antes (línea continua) y después (línea de puntos) del estímulo. B) Umbral para generar LTP en animales tratados con VEH+COC (n=10) y 7-NI+COC (n=10) y sus respectivos controles, VEH+SAL (n=6) y 7-NI+SAL (n=4); $*p<0,05$ comparado con sus respectivos controles; $\#p<0,05$ comparado con VEH+COC. Las barras representan las medias \pm SE.

Tal como fue expresado en los experimentos conductuales, a pesar de haber recibido 7-NI, se encontró un grupo de animales sensibilizados (31,04%). Los animales pertenecientes al grupo 7-NI+COC-SENS evidenciaron una reducción significativa en el umbral para generar LTP respecto al grupo 7-NI+COC-NO SENS (*datos no mostrados*).

Para determinar la selectividad de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc se redujo la disponibilidad de GMPc utilizando un inhibidor de GC (ODQ). Los resultados obtenidos evidenciaron que ODQ, al igual que 7-NI, es capaz de revertir parcialmente el aumento en la transmisión sináptica observado con cocaína [$F_{(1,25)}=15,99$; $p<0,001$; post hoc SNK $^{\#}p<0,05$](Figura 22A).

Por el contrario, cuando se activó la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc reduciendo la hidrólisis de GMPc (con SIL), se observó un aumento en la plasticidad sináptica en el grupo que recibió SIL+COC, mientras que no se hallaron diferencias en el umbral para generar LTP entre SIL+COC y VEH+COC. Interesantemente, la administración repetida de SIL+SAL indujo una reducción en el umbral para generar LTP en comparación con el grupo VEH+SAL [$F_{(1,26)}=28,40$; $p<0,001$; post hoc SNK $^*p<0,05$](Figura 22B).

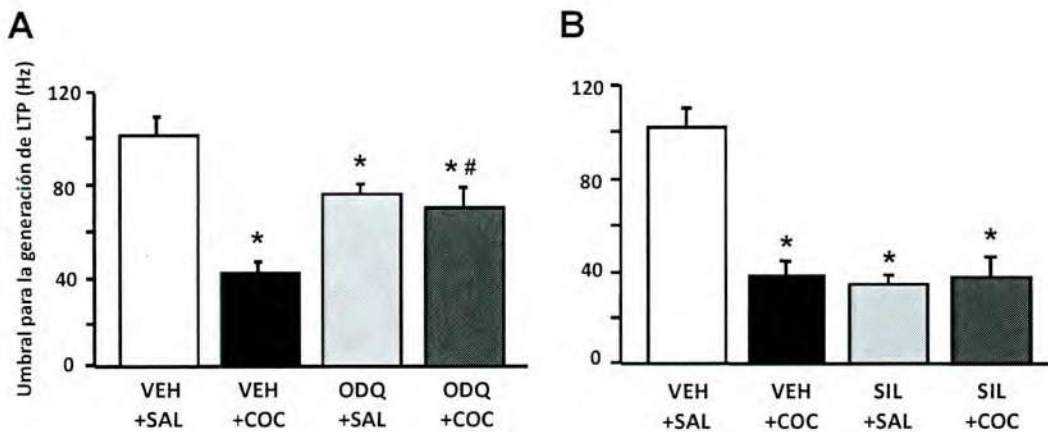


Figura 22: Umbral para generar LTP en animales tratados con **A)** VEH+COC ($n=10$) y ODQ+COC ($n=8$) y sus respectivos controles, VEH+SAL ($n=6$) y ODQ+SAL ($n=5$); $^*p<0,05$ comparado con el grupo VEH+SAL; $^{\#}p<0,05$ en comparación con VEH+COC; **B)** VEH+COC ($n=10$) y SIL+COC ($n=7$) y sus respectivos controles, VEH+SAL ($n=6$) y SIL+SAL ($n=7$) $^*p<0,05$ comparado con el grupo VEH+SAL. Las barras representan las medias \pm SE.

En estos últimos experimentos, a pesar de haber recibido ODQ, o SIL, también se encontraron los grupos de animales sensibilizados y no sensibilizados. En todos los

casos, los grupos de animales que cumplen el criterio de SENS (independientemente del inhibidor recibido) muestran una reducción en el umbral para generar LTP respecto a los grupos NO SENS (*datos no mostrados*).

2.2. Impacto de una única administración de los diferentes potenciadores o inhibidores de la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc en la transmisión sináptica en el hipocampo.

Para determinar si los cambios observados en la transmisión sináptica fueron consecuencia del tratamiento crónico y no de la exposición aguda al psicofármaco, se administraron nuevos grupos de animales con una única dosis (administración aguda) de SAL, COC, 7-NI, ODQ o SIL. Los animales que recibieron una única administración de COC, no evidenciaron incrementos en la transmisión sináptica respecto a su control SAL, lo cual afirma el hecho de que la reducción observada luego de la administración repetida de cocaína es producto del tratamiento crónico. Asimismo, no se observaron diferencias en aquellos animales que recibieron una única inyección de 7-NI u ODQ. Sin embargo, resulta importante destacar la reducción significativa en el umbral para generar LTP observada en aquellos animales que recibieron una única inyección de sildenafil [$F_{(4,21)}=25,19$; $p<0,05$; pos hoc SNK $*p<0,05$](Figura 23).

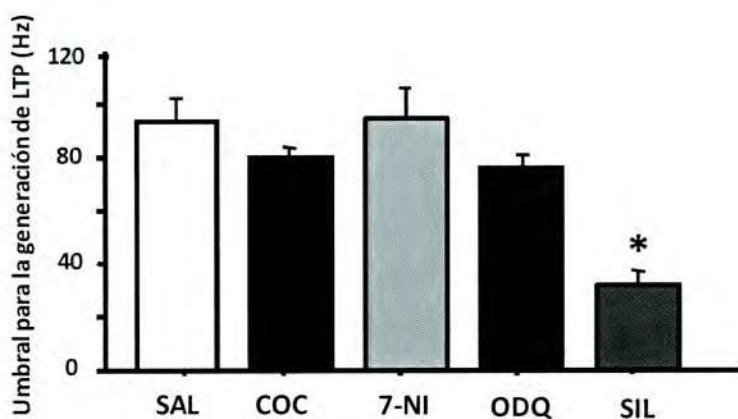


Figura 23: Umbral para generar LTP en animales que recibieron una única administración de VEH+SAL, VEH+COC, VEH+7-NI, VEH+ODQ y VEH+SIL ($n=5$ para cada grupo). Las barras representan las medias \pm SE.

2.3. Efecto de la administración crónica de cocaína sobre la retención de la memoria.

Dado que los resultados electrofisiológicos demuestran que la administración sistémica y repetida de cocaína aumenta la transmisión sináptica en el hipocampo, nos propusimos evaluar el rendimiento de los animales en el test de evitación inhibitoria (step down), un test comportamental que permite medir la retención de una memoria dependiente del hipocampo. La prueba de Kruskal Wallis reveló que la administración repetida de cocaína indujo un aumento significativo en el tiempo de latencia cuando se compara a VEH+SAL [$H=5,10$; $dp=1$; $*p<0,05$] (Figura 24A). Cuando se analizó la performance teniendo en cuenta la separación de los animales según el criterio de sensibilización, los resultados mostraron que sólo los animales sensibilizados (VEH+COC-S) evidenciaron un aumento significativo en el tiempo de latencia, mientras que los no sensibilizados no mostraron diferencias respecto a los controles [$H=15,05$; $df=2$; $\#p<0,05$] (Figura 24B).

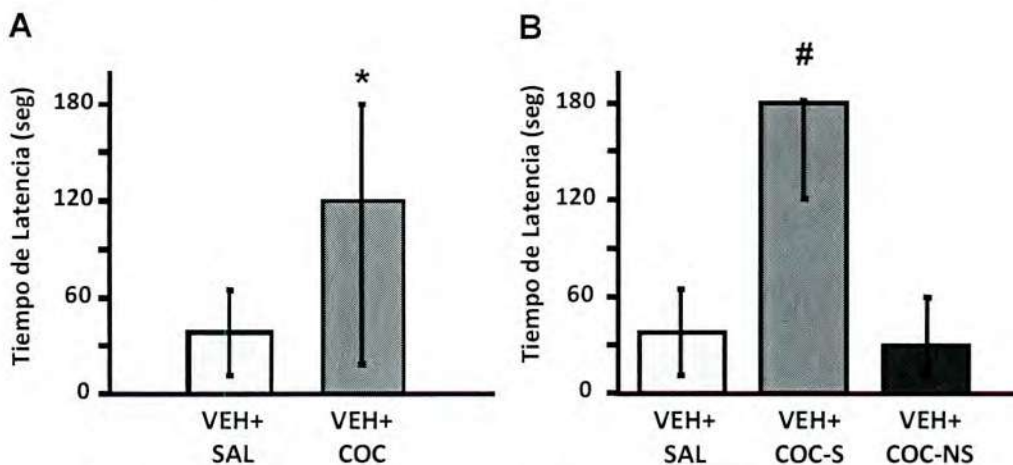


Figura 24: Efecto de la administración repetida de cocaína en la retención de la memoria. Se cuantificó el tiempo de latencia (en segundos) en el test de evitación inhibitoria (o step down) en animales: **A)** que recibieron tratamiento repetido con VEH+SAL o VEH+COC y **B)** VEH+SAL ($n=8$), VEH+COC-S ($n=8$) y VEH+COC-NS ($n=7$). Los resultados se expresan como mediana y rango intercuartil; $*p<0,05$ en comparación con el grupo VEH+SAL; $\#p<0,05$ en comparación con VEH+SAL y VEH+COC-NS.

CONCLUSIÓN

Estos resultados nos permiten afirmar que cocaína es capaz de aumentar la plasticidad sináptica en el hipocampo, medido como una disminución en el umbral para la generación del LTP. Esta alta eficacia de la transmisión sináptica sería el

resultado de los cambios estructurales y neuroquímicos que subyacen a las modificaciones persistentes de la función cerebral después de la exposición repetida o durante el síndrome de abstinencia a drogas de abuso. El aumento en el tiempo de latencia en el test de evitación inhibitoria condice con estos resultados, indicando que existe un aumento en la retención de la memoria (memoria dependiente de hipocampo) sólo en aquellos animales que sensibilizan a la droga. Estos resultados indicarían que los cambios plásticos que se desarrollan en el hipocampo durante la sensibilización a cocaína podrían influenciar la adquisición de una memoria dependiente de hipocampo, y esta mejora en los mecanismos de almacenamiento podría ser “patológicamente” usurpada para instalar y mantener el comportamiento adictivo.

En contraposición, la inhibición de la enzima NOSn y de GC son capaces de prevenir el aumento en la plasticidad sináptica observados con cocaína, mientras que la inhibición de la hidrólisis de GMPc (con SIL) genera niveles de plasticidad sináptica comparables con los observados con cocaína, manteniendo la disminución en el umbral para la generación de LTP. Estos resultados enfatizan la importancia de la vía estudiada en los fenómenos plásticos que ocurren en el desarrollo de la sensibilización. No menos importante resulta el hecho de observar que una única administración de sildenafil es capaz de promover un incremento en la plasticidad sináptica hipocampal por activación directa de la vía en un eslabón cascada abajo, lo cual sugeriría que los inhibidores de PDE₅ activarían vías de señalización utilizadas por cocaína, y si estas drogas se utilizan de manera concomitante, los PDE₅ aumentarían la vulnerabilidad a la adicción a este y probablemente a otros psicoestimulantes.

3. Cambios en la expresión y funcionalidad de la enzima NOS en el hipocampo asociados a la sensibilización a cocaína.

ANTECEDENTES

Ha sido demostrado que la sensibilización a cocaína está asociada a aumentos en la actividad de la enzima NOSn en diferentes regiones del cerebro de ratones (Bhargava and Kumar 1997) como también aumentos en la expresión de NOSn en corteza pre-frontal medial de ratas después de la última administración de cocaína (Loftis and Janowsky 2000). Por otra parte, estudios realizados en cerebro de humanos alcohólicos demostraron un aumento en los niveles de proteína NOS en algunas estructuras relacionadas al circuito mesolímbico sugiriendo que el consumo repetido de alcohol podría activar vías dependientes de óxido nítrico contribuyendo al desarrollo de la adicción (Gerlach et al. 2001).

PROCEDIMIENTO

A fin de evaluar si los efectos de cocaína podrían estar mediados por cambios en la actividad de NOS y/o en la cantidad de enzima disponible, se determinó, en primera instancia, la actividad de dicha enzima en animales sensibilizados y no sensibilizados correspondientes a los grupos **VEH+SAL**, **VEH+COC**, **7-NI+SAL** y **7NI+COC** del *diseño experimental 1*. Veinticuatro horas después de la última administración, los animales recibieron una dosis “challenge” o desafío de COC (15 mg/kg), con el fin de garantizar la activación de NOS y 20 minutos post-inyección, que corresponde con el tiempo de efecto máximo de cocaína, se procedió al sacrificio y posterior extracción del hipocampo. Dos grupos adicionales de animales recibieron una dosis única (agudo) de COC o SAL, y luego de 20 minutos se procedió al sacrificio y posterior extracción de dicha estructura. La actividad de la enzima NOS se determinó según fue expresado en la sección de *Materiales y Métodos: Generalidades*, mediante el método descrito por Bredt et al (Bredt et al. 1990).

Por otra parte se cuantificó el número de células positivas para NOSn en tres áreas del hipocampo (gyrus dentado, CA1 y CA3) por medio de una técnica inmunohistoquímica en los grupos **VEH+SAL**, **VEH+COC-S** y **VEH+COC-NS**, tratados

según el **diseño 1**. Asimismo, para evaluar si los cambios que pudieran observarse en la actividad de la enzima, son producto de variaciones en los niveles de proteína NOSn, se determinó, en los grupos antes mencionados, la expresión de NOSn en hipocampo, por medio de la técnica de Western Blot. Se adicionaron, además, tres grupos de animales: un grupo de animales “naive”, es decir, que no recibió ningún tipo de inyección ni estímulo, otro grupo que recibió una sola inyección de VEH+SAL y un tercer grupo que recibió una única administración de VEH+COC, estos dos últimos denominados como “agudos” y utilizados como controles del tratamiento repetido. Veinte minutos post-inyección se procedió a sacrificar a los animales y preparar la muestra tal como se explicó en la sección **Materiales y Métodos: Generalidades**.

RESULTADOS

3.1. Actividad de NOS en la sensibilización a cocaína

La figura 25A muestra un aumento significativo en los niveles de NO en el grupo VEH+COC-S respecto a los demás grupos evaluados, y resulta importante destacar que en los animales que mostraron sensibilización conductual aún en presencia de 7-NI previo a cocaína (7-NI+COC-S) se impidió dicho incremento [$F_{(2,35)}=9,49$; $p<0,05$; post hoc SNK * $p<0,05$]. La figura 25B muestra el porcentaje de incremento en los niveles de NO en animales que recibieron una administración aguda de cocaína (VEH+COC-Agudo) o animales que sensibilizaron después de recibir el tratamiento repetido de cocaína (VEH+COC-S) con respecto a sus controles (VEH+SAL-Agudo y VEH+SAL respectivamente). Si bien los niveles de NO en ambos grupos incrementaron en relación a sus respectivos controles, se observó un aumento significativo en el grupo VEH+COC-S en comparación con VEH+COC-agudo [$F_{(1,13)}=11,36$; * $p<0,05$].

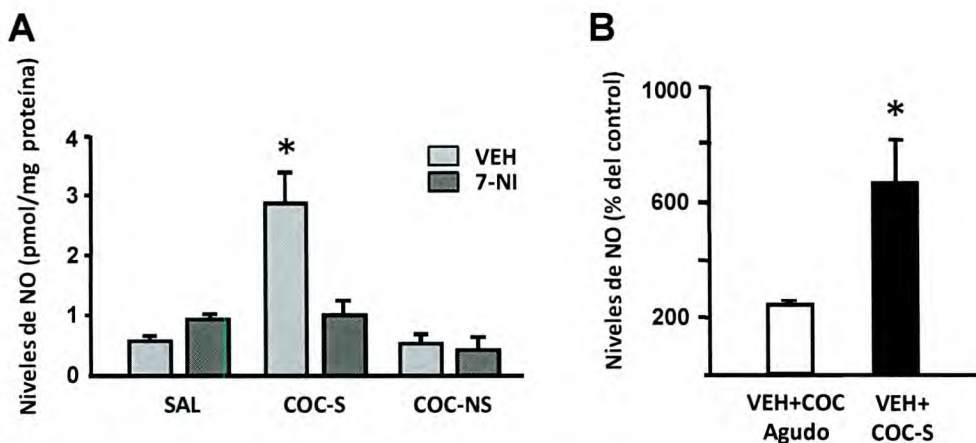


Figura 25: A) Niveles de NO en grupos sensibilizados y no sensibilizados, sin (VEH+COC-S n=8; VEH+COC-NS n=7) o con la inhibición de NOSn (7-NI+COC-S n=5; 7-NI+COC-NS n=5); y sus controles (VEH+SAL n=10; 7-NI+SAL n=6), *p<0,05. Los resultados se expresan como medias de picomoles de NO por miligramo de proteína ± S.E.; **B)** Animales tratados con una única inyección de cocaína (VEH+COC-Agudo; n=6) y sensibilizados luego de la administración repetida de cocaína (VEH+COC-S; n=7), *p<0,05. Los resultados se expresan como porcentaje de las medias de sus respectivos controles (VEH+SAL-Agudo y VEH+SAL) ± S.E.

Interesantemente, cuando se analizó la relación entre los niveles de NO y el porcentaje de incremento en la actividad locomotora en el día 5 en los grupos VEH+COC-S y VEH+COC-NS, se encontró una correlación positiva (Correlación de Pearson $r=0.79$; $p=0,0004$; Figura 26A). Por otra parte, cuando se analizó la misma correlación en los animales que recibieron 7-NI antes de COC (7-NI+COC-S y el 7-NI+COC-NS) se reveló un debilitamiento de esta correlación (correlación de Pearson $r=0.29$; $p=0,4020$; Figura 26B).

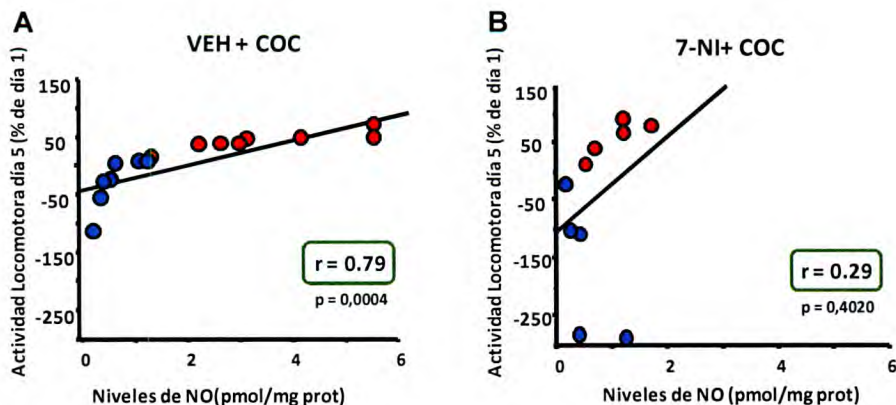


Figura 26: Correlación entre el porcentaje de aumento de la actividad locomotora (día 5 respecto al día 1) y los niveles de NO (pmol/mg de proteína) en **A)** VEH+COC sensibilizados (en rojo) y no sensibilizados (en azul); y **B)** 7-NI+COC sensibilizados (en rojo) y no sensibilizados (en azul).

3.2. Número de células positivas NOSn en hipocampo

No se observaron diferencias en el número de células positivas para NOSn en el *gyrus dentado* [$F_{(2,10)}=1,30$; $p>0,05$], **CA1** [$F_{(2,9)}=0,57$; $p>0,05$], y **CA3** [$F_{(2,9)}=0,34$; $p>0,05$] del hipocampo de animales sensibilizados y no sensibilizados luego de la administración de cocaína (Figura 27 y 28).

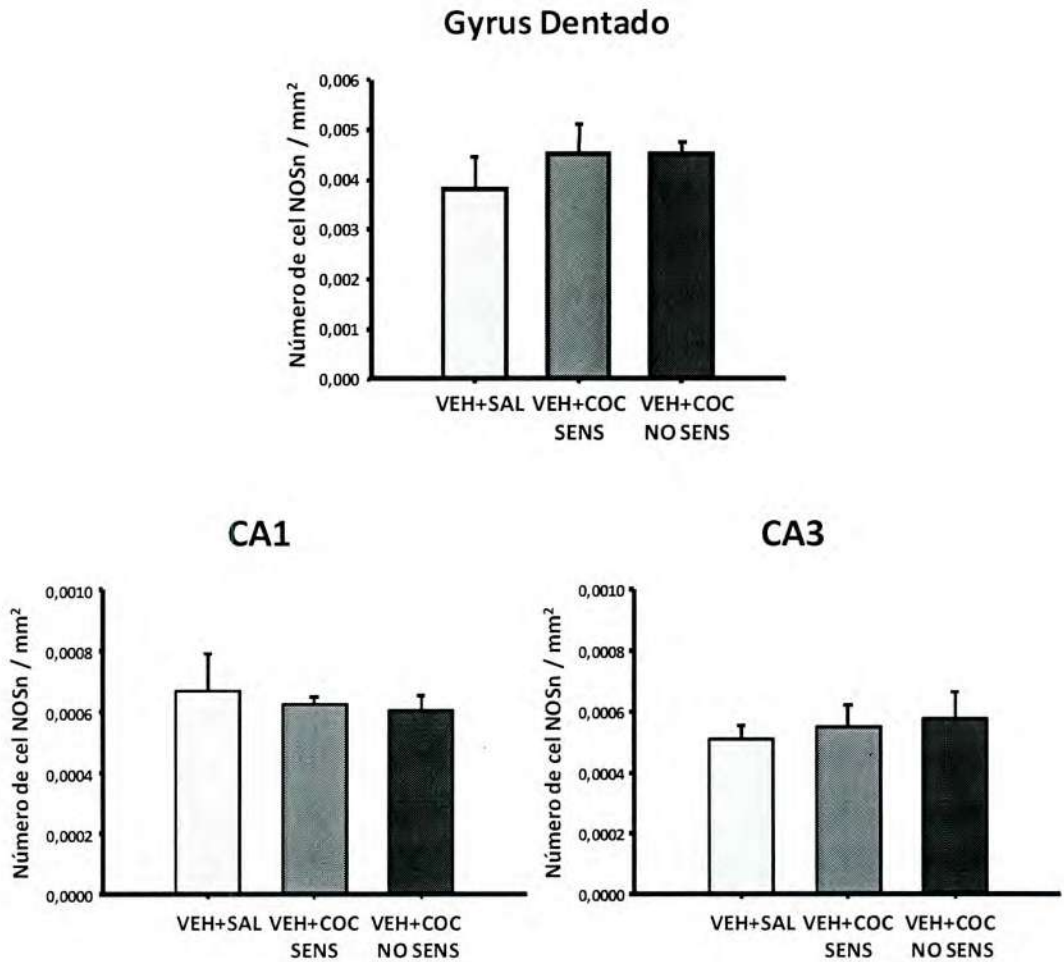


Figura 27: Número de células positivas para NOSn en los grupos VEH+SAL (n=4), VEH+COC-S (n=4) y VEH+COC-NS (n=4) en *gyrus dentado*, CA1 y CA3 de hipocampo.

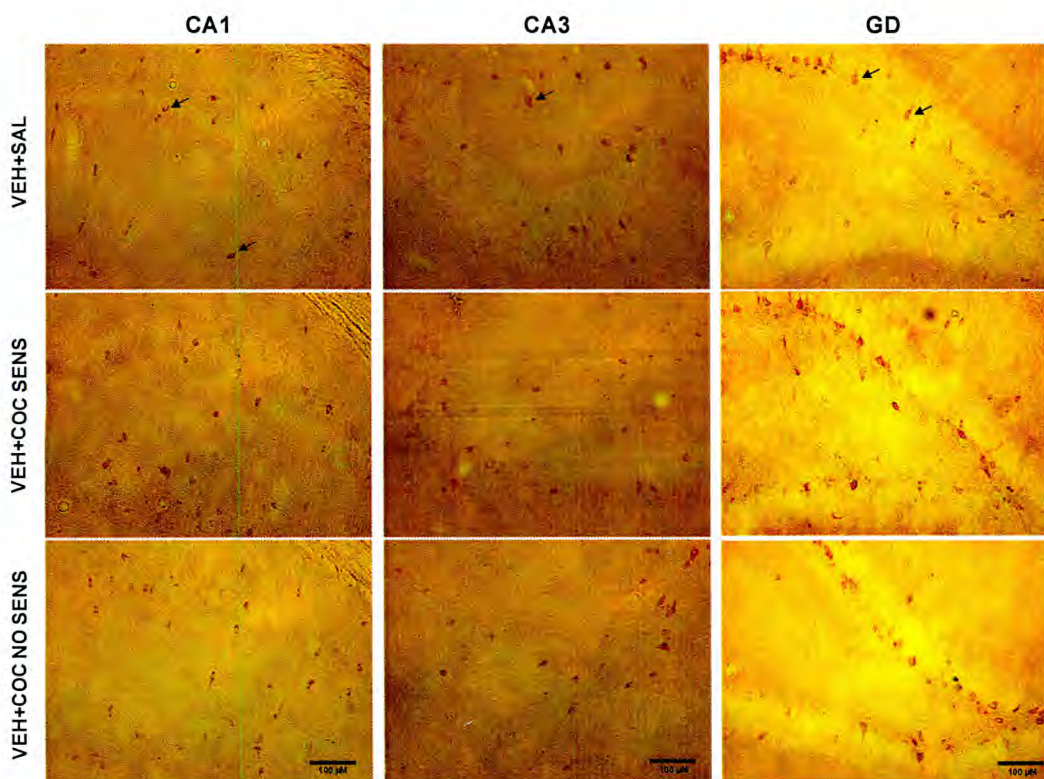


Figura 28: Fotomicrografías: Corte coronal que muestra las neuronas NOSn positivas en las distintas áreas del hipocampo analizadas: a) CA1; b) CA3 y c) gyrus dentado.

Como estructura control se utilizó la corteza motora donde no se observaron diferencias significativas en las células positivas para NOSn en los distintos grupos analizados [$F_{(2,9)}=1,75$; $p>0,05$](*datos no mostrados*).

3.3. Expresión de NOSn en hipocampo

Los resultados obtenidos respecto a la expresión de proteína NOSn en hipocampo mostraron un incremento significativo solo en el grupo de animales que sensibilizaron luego del tratamiento con cocaína (VEH+COC-S) respecto al grupo no sensibilizado (VEH+COC-NS) y al control (VEH+SAL) [$F_{(2,12)}=7,6512$; $p=0,007$; post hoc SNK * $p<0,05$] (Figura 29)

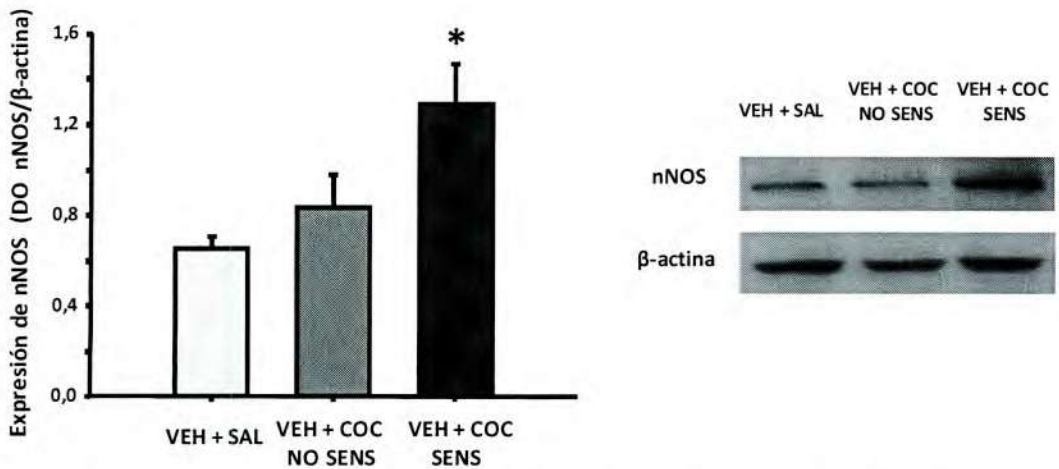


Figura 29: Expresión de la proteína NOSn en hipocampo de sujetos tratados con VEH+SAL (n=5), VEH+COC-S (n=5) y VEH+COC-NS (n=5). A la derecha, imágenes representativas del revelado de western blot de la enzima en los distintos grupos experimentales.

Por otra parte, en el grupo de animales naive, es decir, que no recibieron tratamiento alguno, y en aquellos grupos que recibieron una única inyección de VEH+SAL o VEH+COC, el test estadístico no evidenció diferencias significativas en la expresión de NOSn en la estructura estudiada [$F_{(2,9)}=0,058$; $p=0,94$] (Figura 30)

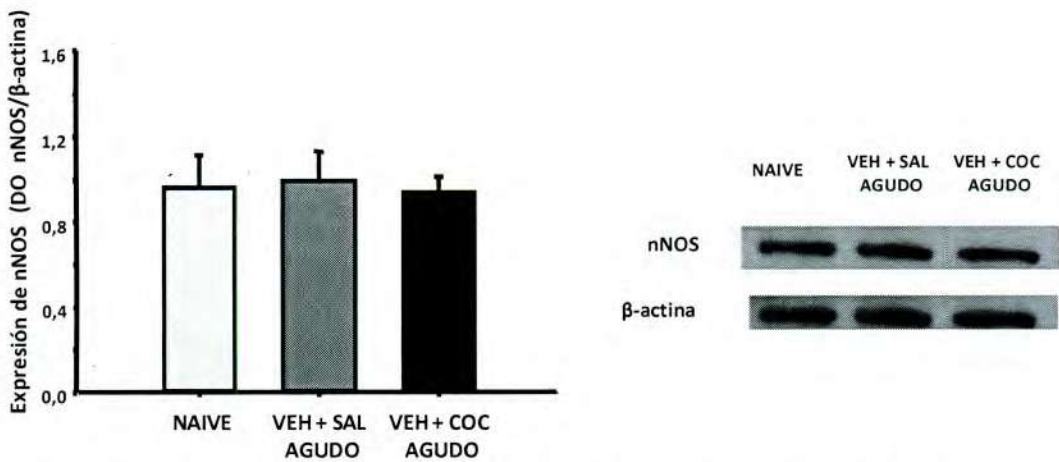


Figura 30: Expresión de la proteína NOSn en hipocampo de sujetos NAIVE (n=4), VEH+SAL agudo (n=4) y VEH+COC agudo (n=4). A la derecha, imágenes representativas del revelado de western blot de la enzima en los distintos grupos experimentales.

CONCLUSIONES PARCIALES

En relación a la actividad de la enzima NOS, los resultados mostraron un incremento significativo en su actividad únicamente en los animales que desarrollan sensibilización conductual a cocaína. Además, el porcentaje de aumento en este grupo, luego del tratamiento crónico, es considerablemente mayor que después de una única administración de cocaína. Esto indicaría que la enzima NOS sufre un proceso neuroadaptativo luego del tratamiento crónico, lo cual podría deberse a modificaciones de la regulación de la actividad o aumentos en la expresión de la proteína en el hipocampo. Los experimentos de western blot indicarían que la causa del incremento en la actividad de la enzima NOS sería producto del incremento en la cantidad de proteína NOSn en células que expresan dicha enzima en la estructura estudiada, ya que no se observaron variaciones en el número de células positivas para NOSn mediante inmunohistoquímica. Estos cambios no se observaron cuando se administró un inhibidor de la NOS, indicando que probablemente la síntesis de NOSn se autorregula positivamente por producto final durante la administración repetida de cocaína, dando lugar al proceso de sensibilización expuesto anteriormente.

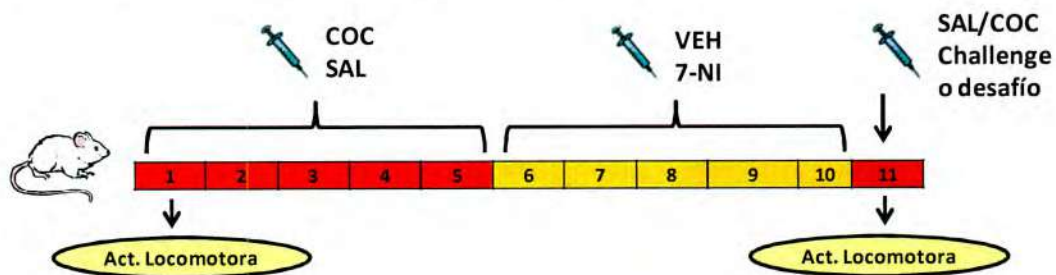
Por otra parte, podemos afirmar que el desarrollo de la sensibilización conductual está asociado con altos niveles de producción de NO en el hipocampo, ya que existe una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre el porcentaje de aumento de la actividad locomotora en el día 5 y la actividad de NOS.

4. Participación de la señalización por óxido nítrico en la *expresión* de la sensibilización conductual a cocaína y en la transmisión sináptica hipocampal asociada.

En este cuarto objetivo, desarrollamos un protocolo que permite modelar una situación comparable a lo que ocurre en la clínica donde se busca la rehabilitación de un paciente adicto, apuntando hacia un uso terapéutico de la intervención de las vías activadas por óxido nítrico. Para ello, inhibimos la enzima NOSn posteriormente a la administración repetida de cocaína, con el objeto de interferir la señalización por óxido nítrico en la *expresión* de la sensibilización conductual como también en la transmisión sináptica asociada.

PROCEDIMIENTO

Los animales fueron administrados vía i.p. con SAL o COC (15 mg/kg) durante 5 días (**días 1 al 5**) y VEH o 7-NI vía i.p. en los 5 días subsiguientes (**días 6 a 10**). En el **día 11** se administró una dosis desafío de COC o SAL. En los **días 1 y 11** se registró la actividad locomotora. Por consiguiente los grupos experimentales considerados fueron: SAL/VEH; COC/VEH; SAL/7-NI y COC/7-NI.



Diseño Experimental 2

Inmediatamente después de la medición de la actividad locomotora en el día 11, los animales fueron sacrificados y los hipocampos disecados con el fin de obtener los registros electrofisiológicos, previa preparación del tejido tal como fue descrito en la sección de **Materiales y Métodos: Generalidades**.

RESULTADOS

4.1. Efecto de la inhibición de NOSn en la expresión de la sensibilización conductual

Cuando se administró VEH posteriormente a la administración repetida de cocaína, se observó un aumento significativo en la actividad locomotora en el día 11 en comparación con el día 1 en el grupo total de COC/VEH respecto al grupo SAL/VEH [$F_{(1,42)}=4,31$; $p=0,044$; Post hoc SNK $^{\#}p<0,05$](Figura 31A). Por otra parte, la administración de 7-NI a lo largo de 5 días luego de la administración repetida de cocaína previno la expresión de la sensibilización, ya que no se observaron cambios significativos en la actividad locomotora en el día 11 comparado con el día 1 [$F_{(1,45)}=0,95$; $p=0,334$] (Figura 31B).

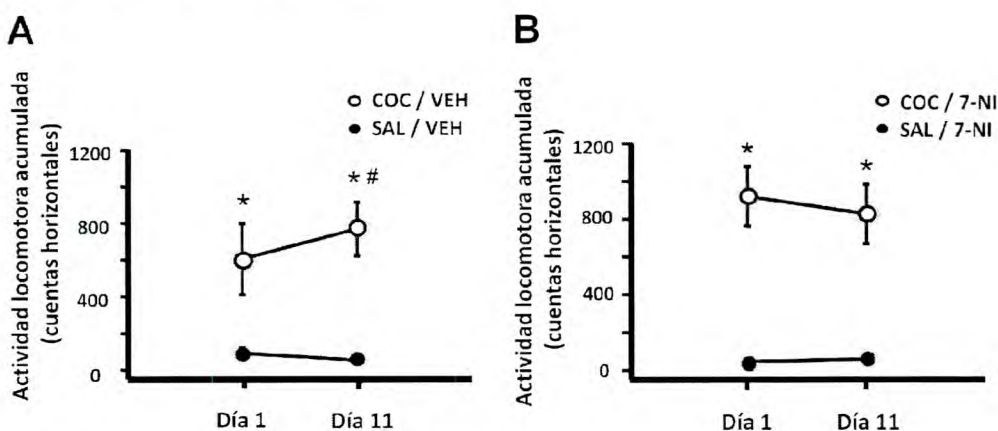


Figura 31: Resultados comportamentales mostrando la actividad locomotora acumulada (50 min) en los días 1 y 11 para **A)** SAL/VEH ($n=16$); COC/VEH ($n=31$); y **B)** SAL/7-NI ($n=14$); COC/7-NI ($n=31$); $^{\#}p<0,05$ comparado con día 1; $^*p<0,05$ comparado con SAL/VEH. Los círculos representan las medias \pm SE.

Sin embargo, cuando los animales fueron analizados individualmente, utilizando el criterio del 20% de incremento, en el grupo COC/VEH se observó que un 41,94% de animales expresó sensibilización, mientras que el 58,06% restante no expresó sensibilización (Figura 32). Es importante destacar que, con este diseño, la proporción de animales que expresó sensibilización, cuando fueron tratados con 7-NI después de cocaína, se redujo significativamente, siendo sólo el 19,35% del total de los animales. La prueba de chi-cuadrado reveló una asociación entre el tratamiento (COC/VEH o COC/7-NI) y el número de animales en ambas condiciones (sensibilizados y no sensibilizados) [$\chi^2_{(0,95)}= 3,718$; $gl=1$; Figura 32A].

Si comparamos el porcentaje de animales sensibilizados entre los dos diseños experimentales utilizados en este trabajo de tesis, la prueba estadística de Chi-cuadrado revela una reducción del porcentaje de animales sensibilizados en el **diseño 2** con respecto al **diseño 1** [$\chi^2_{(0,95)} = 1,399$; $gl=1$; Figura 32; COC/7-NI vs 7-NI+COC] en los animales tratados con 7-NI (Figura 32B).

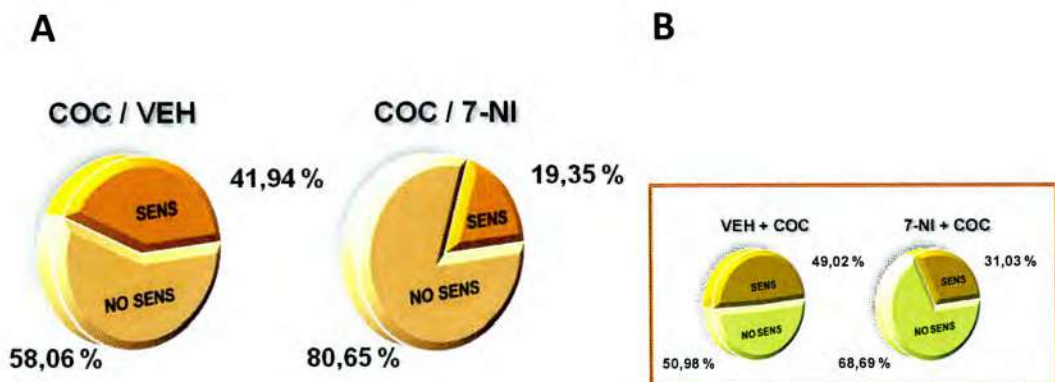


Figura 32: Porcentaje de animales sensibilizados y no sensibilizados luego de la administración de: **A)** COC/VEH o COC/7NI (**Diseño 2**); **B)** comparación con animales que recibieron tratamiento conjunto con VEH+COC o 7-NI+COC por 5 días (**Diseño 1**)

4.2. Impacto de la inhibición de NOSn en la plasticidad sináptica en el hipocampo

En el grupo que recibió tratamiento con COC/VEH, seguido de un challenge de COC, se observó que la administración repetida de cocaína facilita la transmisión sináptica en el hipocampo (expresado como una reducción en el umbral para generar LTP), demostrando una vez más que cocaína es capaz de aumentar la plasticidad sináptica. Por otra parte, en los animales que recibieron tratamiento con COC/7-NI, y luego un challenge de COC, se observó una reversión parcial en el umbral para generar LTP en comparación con COC/VEH [$F_{(1,26)}=5,09$; $p<0,05$; Post hoc SNK * $p<0,05$] (Figura 33).

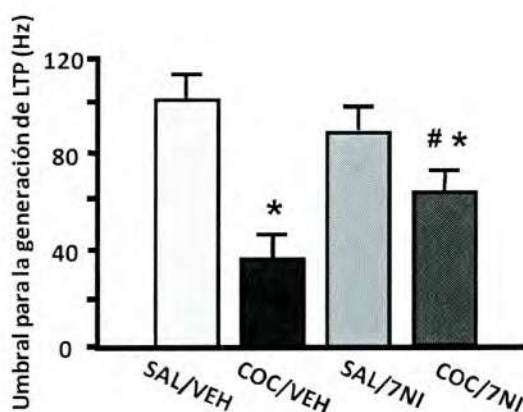


Figura 33: Umbral para generar LTP en animales tratados con COC/VEH (n=10) y COC/7-NI (n=10) y sus respectivos controles, SAL/VEH (n=4) y SAL/7-NI (n=6); *p<0,05 comparado con sus respectivos controles; #p<0,05 comparado con COC/VEH. Las barras representan las medias \pm SE.

CONCLUSIONES PARCIALES

La inhibición de NOSn tanto conjuntamente a la administración de cocaína como posteriormente al tratamiento con el psicofármaco es capaz de reducir el porcentaje de animales sensibilizados.

Estos resultados demuestran que la interferencia en la actividad de la enzima NOSn después de la instauración de la sensibilización a cocaína previene la expresión conductual de la misma, y revierte parcialmente la facilitación en el umbral obtenida con COC/VEH.

Este hecho resulta sumamente valioso ya que proporciona una herramienta terapéutica más próxima a lo requerido para evitar o reducir la recaída al consumo de este tipo de psicoestimulantes

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

La cocaína sigue siendo una de las drogas de abuso más utilizadas y la adicción a drogas una de las patologías más difíciles de tratar. A pesar de que se han realizado numerosos esfuerzos para desarrollar tratamientos eficaces, y los avances en materia experimental más sofisticados y tecnológicos, las tasas de recaída al consumo en adictos recuperados siguen siendo alarmantemente altas. Asimismo, si bien en las últimas décadas se han producido una gran cantidad de estudios en humanos sobre los efectos de cocaína en el cerebro, todavía existe un conocimiento relativamente incompleto acerca de los procesos neurobiológicos que ocurren durante la adicción a drogas.

Se hace cada vez más evidente la existencia de un paralelismo entre los ámbitos del aprendizaje y memoria y los de la adicción (Berke and Hyman 2000), ya que algunas de las mismas preguntas que se han planteado en el aprendizaje y la memoria son también de interés en la adicción a drogas, como por ejemplo, ¿Cómo y dónde se inicia primeramente la memoria de recompensa y cuáles son los componentes moleculares y celulares subyacentes?

El circuito neuronal involucrado en la sensibilización a cocaína es complejo, ya que la sensibilización se genera por una cascada de eventos que involucran diferentes regiones del cerebro y distintos sistemas de neurotransmisión (Wolf 2002). Las neuronas de NAc reciben, entre otras, aferencias glutamatérgicas desde el hipocampo (Kelley and Domesick 1982), y las influencias excitatorias de dichas aferencias serían cruciales para la modulación sináptica involucrada en el proceso de adicción (Wallace et al. 1992). En base a los antecedentes previamente expresados, la estructura cerebral con la que se trabajó en este estudio fue el hipocampo, la cual se sabe que participa en diversas formas de plasticidad sináptica, propias de procesos de aprendizaje, como también en la memoria patológica y en los aspectos motivacionales que subyacen a la adicción y que son importantes en la recaída al consumo de la droga.

Los estudios científicos sustentan que el fenómeno de sensibilización subyace a la búsqueda y la recaída a las drogas de abuso, incluyendo cocaína (Steketee 2005; Belujon and Grace 2011). Aunque diferentes protocolos de administración repetida de

cocaína han mostrado desarrollar sensibilización (Pierce et al. 1996; Yamaguchi et al. 2005), este fenómeno sólo se da en una proporción de los animales tratados, incluso cuando los protocolos utilizados varían en la duración del tratamiento repetido con cocaína y las dosis administrada (Pierce et al. 1996; Boudreau and Wolf 2005), por lo que, al parecer, la proporción de sujetos sensibilizados y no sensibilizados es independiente del protocolo de administración utilizado (Perez et al. 2010). Es importante destacar, que en todos los casos, incluido este estudio, los animales no sensibilizados mostraron una mayor actividad locomotora luego de la primera exposición a cocaína en comparación con el primer día de exposición en los animales sensibilizados. Los mecanismos que subyacen a esta respuesta diferencial entre sujetos sensibilizados y no sensibilizados aún se desconocen.

En este estudio demostramos que, la administración repetida de cocaína induce sensibilización comportamental aproximadamente en el 50% de los animales tratados y ésta se correlaciona con un incremento en la plasticidad sináptica hipocampal, la cual es mayor en aquellos animales que desarrollan sensibilización. También hemos observado un aumento en la actividad de la enzima NOS, y en los niveles de proteína NOSn en este mismo grupo de animales.

El hecho de poder discriminar entre individuos sensibilizados y no sensibilizados, y estudiar las diferencias que pueden existir en cada grupo, es de suma importancia para dilucidar los mecanismos que determinan la vulnerabilidad a la adicción, y esto permite hacer una comparación con lo que ocurre en los humanos, donde se sabe que, no todos los sujetos que se exponen a una droga de abuso, como cocaína, desarrollan adicción.

EL OXIDO NÍTRICO COMO INTERMEDIARIO EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA Y LA SENSIBILIZACIÓN A COCAÍNA

El óxido nítrico, es un neurotransmisor gaseoso que estaría involucrado tanto en la adquisición como en el mantenimiento de los efectos comportamentales de cocaína y otras drogas psicoactivas. Se ha demostrado que el bloqueo de la producción de óxido nítrico mediante la administración sistémica de inhibidores de NOS interfieren con el desarrollo de sensibilización a la activación locomotora inducida por

psicoestimulantes (Pudiak and Bozarth 1993; Kim and Park 1995; Haracz et al. 1997; Itzhak 1997) y también se conoce que la delección del gen NOSn^(-/-) en ratones previene la sensibilización locomotora inducida por cocaína (Haracz et al. 1997; Itzhak 1997). En este trabajo de tesis, los resultados conductuales con un inhibidor selectivo de NOSn (7-NI) corroboraron estudios previos al analizar el total de los sujetos tratados con 7-NI+COC (Figura 16A). Sin embargo, siguiendo el criterio del 20% de incremento en la actividad locomotora, discriminamos a estos animales en dos grupos: sensibilizados y no sensibilizados, y observamos que la co-administración de 7-NI aumenta significativamente el porcentaje de animales no sensibilizados respecto al tratamiento crónico con cocaína. Estos resultados indican que el tratamiento con 7-NI interfiere con el desarrollo de sensibilización conductual inducido por cocaína. Por otra parte, cuando el inhibidor de la enzima se administró una vez concluido el tratamiento repetido con cocaína, el porcentaje de animales no sensibilizados aumentó a un 80,65% (Figura 31B). Esto último nos permite expresar que la inhibición de la enzima con posterioridad al tratamiento repetido con cocaína es capaz de prevenir la expresión de la sensibilización. El tipo de tratamiento utilizado en el **diseño experimental 2** resulta relevante en la terapia ya que proporciona un modelo más similar a lo que ocurre en un adicto en tratamiento o en recuperación, donde lo que se busca es tratar al individuo para evitar la recaída.

La activación de la vía cascada abajo del óxido nítrico, aumentando la disponibilidad de GMPc por sildenafil, mostró un aumento en la proporción de animales sensibilizados, mientras que el bloqueo de esta vía redujo significativamente dicha proporción (Tabla 1). La inhibición de GCs, por ODQ, impide la sensibilización sin afectar el efecto hiperlocomotor de cocaína, mientras que la inhibición de NOSn no sólo impide la sensibilización a cocaína sino que también reduce parcialmente el efecto hiperlocomotor, indicando que la inhibición más específica de la vía delimita su participación en la sensibilización sin afectar otras funciones. Estos resultados apoyarían la implicancia de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc en la vulnerabilidad a desarrollar sensibilización a cocaína.

El NAc funciona como una interfaz entre el sistema límbico y el motor (Groenewegen et al. 1999; Kelley 1999), y el comportamiento de búsqueda de la droga

depende de la transmisión glutamatérgica en esta estructura (Steketee and Kalivas 2011). El hipocampo envía aferencias glutamatérgicas hacia el NAc (Kelley and Domesick 1982; French and Totterdell 2002), y los cambios sinápticos que se producen en esta estructura pueden afectar los niveles de actividad neuronal en el NAc. La LTP ha sido postulada como el mayor mecanismo de almacenamiento de información en el cerebro que consiste en la facilitación de la transmisión sináptica en ciertas regiones como el hipocampo. A fin de que la activación post-sináptica sea mantenida, el óxido nítrico ha sido postulado como mensajero retrógrado, capaz de comunicar dicha post-sinapsis con el componente pre-sináptico (Lancaster 1994). Numerosos estudios respaldan el rol del óxido nítrico en la plasticidad y la LTP (Schuman and Madison 1991; Prast and Philippu 2001; Bon and Garthwaite 2003) y muestran que promueve la liberación de glutamato por medio de una vía dependiente de GMPc (O'Dell et al. 1994; Son et al. 1996), como así también regula la liberación de dopamina (Schulman 1997).

De la misma manera, se ha postulado que la LTP en el hipocampo puede jugar un papel en el aprendizaje asociativo complejo que contribuye al comportamiento de búsqueda de la droga y la recaída (Wolf 2002). Asimismo, ha sido descrito que el tratamiento crónico con cocaína incrementa la magnitud de la potenciación del LTP en hipocampo luego de una estimulación de 100 Hz (Thompson et al. 2002) y que la estimulación del subíulum ventral del hipocampo reinstala el comportamiento de búsqueda a cocaína en ratas (Vorel et al. 2001). En nuestro trabajo, se observó que el tratamiento crónico con cocaína genera una disminución en el umbral para generar LTP, y esta disminución es considerablemente menor en los animales que desarrollan sensibilización. A pesar de que se sabe que el óxido nítrico es una pieza importante en la inducción del LTP, no existen antecedentes que demuestren la participación de dicho neurotransmisor en los cambios plásticos inducidos por cocaína en el hipocampo. Nuestros resultados indicarían que la inhibición de NOSn revierte parcialmente el efecto de cocaína sobre la plasticidad sináptica (Figura 21B), indicando que la señalización por óxido nítrico es importante, en parte, para la expresión de este fenómeno.

En este trabajo observamos que la sensibilización a cocaína indujo un aumento en la transmisión sináptica del hipocampo (observado como una reducción en el umbral para generar LTP). Esta mejora se previno con la inhibición de NOSn (Figura 21B). Resultados similares se observaron cuando se inhibió GCs con la administración de ODQ durante el tratamiento con cocaína (Figura 22A). Por otro lado, cuando se incrementó la disponibilidad de GMPc con el uso de SIL, la facilitación de la transmisión sináptica producida por cocaína se mantuvo (Figura 22B). Esta facilitación podría indicar una mayor susceptibilidad a estímulos capaces de activar sinapsis glutamatérgicas. Por lo tanto, la activación de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc por cocaína puede facilitar la generación de la LTP en el hipocampo, activando vías glutamatérgicas que proyectan hacia el NAc, finalmente responsables del control motor y la ejecución de conductas que llevan a la sensibilización. Sorprendentemente, tanto la administración aguda como repetida con sildenafil facilitó la transmisión sináptica en el gyrus dentado del hipocampo, indicando una posible mejora en la fuerza de las sinapsis glutamatérgicas con solo una administración. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores que muestran que sildenafil es capaz de inducir retención de la memoria a largo plazo y reconsolidación (Puzzo et al. 2008; Boccia et al. 2011) y consigue recuperar la plasticidad sináptica en la enfermedad de Alzheimer en un modelo de ratón (Puzzo et al. 2009).

Si se considera al hipocampo como una estructura fundamental en los procesos de aprendizaje asociativos que subyacen a la adicción a drogas, los resultados observados en el presente estudio indicarían que la plasticidad sináptica en dicha estructura resulta relevante, y evidenciarían un rol importante del gyrus dentado hipocampal en el desarrollo de sensibilización a cocaína. Considerando de manera conjunta estos resultados, los mismos apoyarían la hipótesis planteada que sostiene que la activación de la vía de señalización NOS/NO/GCs/GMPc podría ser considerada como uno de los mecanismos por el cual el óxido nítrico participa en el desarrollo de sensibilización y en el fenómeno plástico observado en el gyrus dentado hipocampal luego de la administración repetida de cocaína.

IMPLICANCIA DE LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE NOS_n EN LA SENSIBILIZACIÓN A COCAÍNA

Se ha comprobado que la ausencia del gen NOS_n^(-/-) en ratones produce una reducción del 95% en la actividad catalítica de la enzima, sugiriendo que esta isoforma es la responsable de la mayor parte de la actividad de NOS en el cerebro (Bredt et al. 1990). También se ha señalado que la exposición aguda a cocaína incrementa la liberación de óxido nítrico en corteza pre-frontal, hipocampo y estriado (Bagetta et al. 1999; Sammut and West 2008) y la exposición repetida incrementa la actividad de NOS_n y en muchas regiones del cerebro como por ejemplo hipocampo, corteza, amígdala, cerebro medio y cerebelo (Bhargava and Kumar 1997). Nuestros resultados mostraron que la actividad de la enzima NOS se ve incrementada sólo en los animales que desarrollan sensibilización conductual a cocaína. Además, el porcentaje de aumento luego del tratamiento repetido es considerablemente mayor que posteriormente a una única administración de cocaína. Esto indicaría que la actividad de la enzima NOS sufre un proceso neuroadaptativo luego del tratamiento repetido, que se correlaciona con el desarrollo de sensibilización conductual y con el aumento de la plasticidad sináptica hipocampal. Dichos incrementos en la actividad de la enzima podrían ser consecuencia de incrementos en la expresión de proteína de la enzima NOS_n, tal como fue señalado en este estudio. Lo expuesto anteriormente está avalado, además, por el análisis de correlación entre el porcentaje de aumento en la actividad locomotora y los niveles de óxido nítrico en los grupos sensibilizados y no sensibilizados, en donde el máximo efecto locomotor está correlacionado positivamente con los niveles elevados de óxido nítrico (Figura 26A). Sin embargo, la correlación se vio debilitada cuando el inhibidor de NOS_n se administró de forma concomitante con cocaína (Figura 26B).

Si bien se observaron cambios en los niveles de proteína de la enzima nNOS que justificarían el incremento en la actividad de la enzima, no podemos descartar que dichos incrementos también puedan deberse a cambios en la regulación de la enzima, ya sea por fosforilación de PKC (dependiente de GMPc) la cual se sabe que reduce la actividad catalítica de la enzima o de CaMK (proteínquinasa Ca⁺² dependiente) que funciona como activador de NOS_n (Rameau et al. 2007). También se sabe que la

fosforilación en ciertas serinas como la S1412 en la cola C-terminal de la molécula de NOSn o la S847 en el α -hélice del dominio reductasa son capaces de aumentar o disminuir la actividad de dicha enzima (Rameau et al. 2004).

Si bien ha sido reportado que dentro de la formación hipocampal, los mayores niveles de células inmunoreactivas para NOS se encontrarían aparentemente en las células granulares del gyrus dentado (Bredt et al. 1991) en el presente estudio no se encontraron variaciones entre los grupos en el número de células positivas para NOSn en esta sub-área del hipocampo, ni tampoco en otras como CA1 y CA3. Los mecanismos moleculares que subyacen al incremento en la síntesis de proteína NOSn todavía no se conocen, sumado al hecho que, la regulación de la síntesis de óxido nítrico es compleja. Sin embargo, nuestros resultados no contradicen lo expuesto anteriormente, ya que el incremento en los niveles de proteína o de actividad de la enzima puede no necesariamente ir acompañado de un aumento en el número de células NOSn en dicha estructura. Al parecer, la regulación de la expresión y la actividad de la enzima NOS jugarían un papel significativo en los efectos de la administración repetida de cocaína, ya que la sensibilización conduce a incrementos en estos dos aspectos (expresión y actividad de la enzima).

La administración sistémica de diferentes moduladores de la vía NOSn/NO/GCs/GMPc, como 7-NI, ODQ o SIL, afectan la disponibilidad de óxido nítrico o GMPc en todo el sistema nervioso central. Así, los cambios observados en el hipocampo pueden deberse a un efecto primario de tales inhibidores en las zonas del cerebro relacionadas con el circuito de recompensa que proyectan a hipocampo, tales como el VTA, modulando la actividad neuronal. No puede descartarse un efecto local en el hipocampo, ya que la administración de una dosis única o el tratamiento repetido de cocaína induce incrementos en la actividad de NOSn en esta área (Figura 25B). Sería interesante verificar si la administración intra-hipocampal del inhibidor de NOSn reproduce los resultados conductuales y electrofisiológicos observados con la administración sistémica para corroborar la implicancia directa del hipocampo en este fenómeno, así como el estudio de la participación del óxido nítrico en los cambios generados por la sensibilización a cocaína en la actividad de otras estructuras cerebrales.

En resumen, este trabajo muestra un papel clave de la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc en el desarrollo de la sensibilización a cocaína y en el aumento de la transmisión sináptica en el hipocampo, ya que la manipulación de esta vía puede afectar significativamente tanto la proporción de animales sensibilizados como el umbral para generar LTP. Sin embargo, las razones por las cuales esta vía está comprometida de manera diferencial en animales sensibilizados o no sensibilizados aún no se ha dilucidado.

RELEVANCIA DE LA VÍA NOSn/NO/GCs/GMPc EN LA VULNERABILIDAD A LA ADICCIÓN

En el presente trabajo de tesis, el sildenafil fue utilizado como una herramienta para incrementar la disponibilidad de GMPc durante la administración repetida de cocaína, sin embargo, el mal uso y el uso recreativo de los inhibidores de la PDE₅ se han descrito en diferentes poblaciones humanas (Smith and Romanelli 2005; Tahsili-Fahadan et al. 2006) y se ha vinculado al uso ilícito de drogas de abuso (McCambridge et al. 2006). Además, el sildenafil se utiliza bajo prescripción médica en casos de patologías crónicas como la hipertensión pulmonar, cardiopatías coronarias, y la disfunción eréctil, entre otras, incluso en pacientes en programas de desintoxicación de drogas.

Teniendo en cuenta los resultados de la presente investigación, se puede especular que la regulación positiva de la vía de señalización NOSn/NO/GCs/GMPc en diferentes áreas del cerebro podría iniciar, contribuir o exacerbar los comportamientos adictivos en los seres humanos, y los inhibidores de PDE₅ ser candidatos potenciales para estas acciones, porque podrían aumentar la vulnerabilidad al abuso de drogas. Asimismo, en base a los antecedentes descritos en investigación básica y la evidencia del uso recreacional de los inhibidores de PDE₅, proponemos que el uso no controlado de estos fármacos podría contribuir al desarrollo de adicción a éstos u otros fármacos administrados de forma concomitante, potenciar una adicción pre-existente o favorecer el riesgo de recaída luego de una potencial recuperación. Es por ello que creemos importante el estudio de los efectos de sildenafil, a nivel del sistema nervioso central, y en el monitoreo de la prescripción de esta droga por su potencial adictivo

con el uso concomitante con otras drogas no necesariamente ilegales, como también la recomendación de un uso supervisado en pacientes con historia previa de adicción.

Los resultados obtenidos podrían ser de suma importancia para la caracterización de nuevas vías de señalización que pudieran ser intervenidas, mediante la exploración de nuevos fármacos con potencial terapéutico para el tratamiento de la adicción a diferentes psicofármacos, que permitan la restauración de una función cerebral normal.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Alderton, W. K., C. E. Cooper, et al. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.
- Aldridge, J. and F. Measham (1999). "Sildenafil (Viagra) is used as a recreational drug in England." BMJ **318**(7184): 669.
- Aliev, G., H. H. Palacios, et al. (2009). "Nitric oxide as an initiator of brain lesions during the development of Alzheimer disease." Neurotox Res **16**(3): 293-305.
- Amaral, D. G., C. Dolorfo, et al. (1991). "Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat." Hippocampus **1**(4): 415-435.
- Anderson, S. M. and R. C. Pierce (2005). "Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement." Pharmacol Ther **106**(3): 389-403.
- Arguello, A. A., G. C. Harburg, et al. (2008). "Time course of morphine's effects on adult hippocampal subgranular zone reveals preferential inhibition of cells in S phase of the cell cycle and a subpopulation of immature neurons." Neuroscience **157**(1): 70-79.
- Assreuy, J., F. Q. Cunha, et al. (1993). "Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide." Br J Pharmacol **108**(3): 833-837.
- Azad, S. C., G. Marsicano, et al. (2001). "Differential role of the nitric oxide pathway on delta(9)-THC-induced central nervous system effects in the mouse." Eur J Neurosci **13**(3): 561-568.
- Badanich, K. A., K. J. Adler, et al. (2006). "Adolescents differ from adults in cocaine conditioned place preference and cocaine-induced dopamine in the nucleus accumbens septi." Eur J Pharmacol **550**(1-3): 95-106.
- Bagetta, G., P. Rodino, et al. (1999). "Systemic administration of cocaine, given alone or in combination with sensory stimuli, differentially affects L-arginine-nitric oxide metabolism in discrete regions of the brain of rat." Neurosci Lett **266**(3): 153-156.
- Bechara, A., A. Casabe, et al. (2010). "Recreational use of phosphodiesterase type 5 inhibitors by healthy young men." J Sex Med **7**(11): 3736-3742.
- Belujon, P. and A. A. Grace (2011). "Hippocampus, amygdala, and stress: interacting systems that affect susceptibility to addiction." Ann N Y Acad Sci **1216**: 114-121.
- Berendse, H. W., Y. Galis-de Graaf, et al. (1992). "Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat." J Comp Neurol **316**(3): 314-347.
- Berendse, H. W. and H. J. Groenewegen (1990). "Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum." J Comp Neurol **299**(2): 187-228.
- Berke, J. D. and S. E. Hyman (2000). "Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory." Neuron **25**(3): 515-532.
- Bernabeu, R., M. L. de Stein, et al. (1995). "Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning." Neuroreport **6**(11): 1498-1500.
- Bhargava, H. N. and S. Kumar (1997). "Sensitization to the locomotor stimulant activity of cocaine is associated with increases in nitric oxide synthase activity in brain regions and spinal cord of mice." Pharmacology **55**(6): 292-298.
- Bi, G. Q. and M. M. Poo (1998). "Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type." J Neurosci **18**(24): 10464-10472.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.

- Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-356.
- Bo, L., T. M. Dawson, et al. (1994). "Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains." Ann Neurol **36**(5): 778-786.
- Boccia, M. M., M. G. Blake, et al. (2011). "Sildenafil, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, enhances memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice." Behav Brain Res **220**(2): 319-324.
- Boehning, D. and S. H. Snyder (2003). "Novel neural modulators." Annu Rev Neurosci **26**: 105-131.
- Bon, C. L. and J. Garthwaite (2003). "On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation." J Neurosci **23**(5): 1941-1948.
- Boudreau, A. C. and M. E. Wolf (2005). "Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens." J Neurosci **25**(40): 9144-9151.
- Bredt, D. S., C. E. Glatt, et al. (1991). "Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase." Neuron **7**(4): 615-624.
- Bredt, D. S., P. M. Hwang, et al. (1990). "Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide." Nature **347**(6295): 768-770.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule." Annu Rev Biochem **63**: 175-195.
- Brenhouse, H. C. and S. L. Andersen (2008). "Delayed extinction and stronger reinstatement of cocaine conditioned place preference in adolescent rats, compared to adults." Behav Neurosci **122**(2): 460-465.
- Brog, J. S., A. Salyapongse, et al. (1993). "The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold." J Comp Neurol **338**(2): 255-278.
- Bruckdorfer, R. (2005). "The basics about nitric oxide." Mol Aspects Med **26**(1-2): 3-31.
- Buccafusco, J. J., A. V. Terry, Jr., et al. (1995). "Spinal NMDA receptor--nitric oxide mediation of the expression of morphine withdrawal symptoms in the rat." Brain Res **679**(2): 189-199.
- Burette, A., U. Zabel, et al. (2002). "Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus." J Neurosci **22**(20): 8961-8970.
- Byrnes, J. J., M. M. Pantke, et al. (2000). "Inhibition of nitric oxide synthase in the ventral tegmental area attenuates cocaine sensitization in rats." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **24**(2): 261-273.
- Carlezon, W. A., Jr. and M. J. Thomas (2009). "Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis." Neuropharmacology **56 Suppl 1**: 122-132.
- Casey, B. J., A. Galvan, et al. (2005). "Changes in cerebral functional organization during cognitive development." Curr Opin Neurobiol **15**(2): 239-244.
- Corbetta, M. and G. L. Shulman (2002). "Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain." Nat Rev Neurosci **3**(3): 201-215.
- Cornish, J. W. and C. P. O'Brien (1996). "Crack cocaine abuse: an epidemic with many public health consequences." Annu Rev Public Health **17**: 259-273.
- Cragnolini, A. B., C. Caruso, et al. (2006). "Alpha-MSH and gamma-MSH modulate early release of hypothalamic PGE2 and NO induced by IL-1beta differently." Neurosci Lett **409**(3): 168-172.
- Chambers, R. A., J. R. Taylor, et al. (2003). "Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability." Am J Psychiatry **160**(6): 1041-1052.

- Christopherson, K. S., B. J. Hillier, et al. (1999). "PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain." J Biol Chem **274**(39): 27467-27473.
- Churchill, L., C. J. Swanson, et al. (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**(6): 2397-2403.
- Dawson, V. L. (1995). "Nitric oxide: role in neurotoxicity." Clin Exp Pharmacol Physiol **22**(4): 305-308.
- Dawson, V. L. and T. M. Dawson (1998). "Nitric oxide in neurodegeneration." Prog Brain Res **118**: 215-229.
- Degoulet, M., C. Rouillon, et al. (2008). "Modulation by the dorsal, but not the ventral, hippocampus of the expression of behavioural sensitization to amphetamine." Int J Neuropsychopharmacol **11**(4): 497-508.
- Del Olmo, N., A. Higuera-Matas, et al. (2007). "Cocaine self-administration improves performance in a highly demanding water maze task." Psychopharmacology (Berl) **195**(1): 19-25.
- Del Olmo, N., M. Miguens, et al. (2006). "Enhancement of hippocampal long-term potentiation induced by cocaine self-administration is maintained during the extinction of this behavior." Brain Res **1116**(1): 120-126.
- Demas, G. E., M. J. Eliasson, et al. (1997). "Inhibition of neuronal nitric oxide synthase increases aggressive behavior in mice." Mol Med **3**(9): 610-616.
- Demirci, D., O. Mutlu, et al. (2014). "Sildenafil enhances locomotor activity in young mice and exerts angiogenic effects in both young and aged mice." Med Sci Monit Basic Res **20**: 15-21.
- Dhir, A. and S. K. Kulkarni (2007). "Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor." Eur J Pharmacol **568**(1-3): 177-185.
- Edelman, G. M. and J. A. Gally (1992). "Nitric oxide: linking space and time in the brain." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 11651-11652.
- Eisch, A. J. and G. C. Harburg (2006). "Opiates, psychostimulants, and adult hippocampal neurogenesis: Insights for addiction and stem cell biology." Hippocampus **16**(3): 271-286.
- Eisch, A. J. and C. D. Mandyam (2004). "Drug dependence and addiction, II: Adult neurogenesis and drug abuse." Am J Psychiatry **161**(3): 426.
- Eloi-Stiven, M. L., N. Channaveeraiah, et al. (2007). "Does marijuana use play a role in the recreational use of sildenafil?" J Fam Pract **56**(11): E1-4.
- Esplugues, J. V. (2002). "NO as a signalling molecule in the nervous system." Br J Pharmacol **135**(5): 1079-1095.
- Everitt, B. J. and M. E. Wolf (2002). "Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective." J Neurosci **22**(9): 3312-3320.
- Fernandez-Espejo, E. (2006). "[The neurobiology of psychostimulant addiction]." Rev Neurol **43**(3): 147-154.
- Fisher, D. G., G. L. Reynolds, et al. (2011). "Methamphetamine and Viagra use: relationship to sexual risk behaviors." Arch Sex Behav **40**(2): 273-279.
- Floresco, S. B., C. L. Todd, et al. (2001). "Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons." J Neurosci **21**(13): 4915-4922.
- Forstermann, U., H. H. Schmidt, et al. (1991). "Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types." Biochem Pharmacol **42**(10): 1849-1857.

- French, S. J. and S. Totterdell (2002). "Hippocampal and prefrontal cortical inputs monosynaptically converge with individual projection neurons of the nucleus accumbens." *J Comp Neurol* **446**(2): 151-165.
- Garthwaite, J. (1991). "Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system." *Trends Neurosci* **14**(2): 60-67.
- Garthwaite, J. (2008). "Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission." *Eur J Neurosci* **27**(11): 2783-2802.
- Garthwaite, J. (2010). "New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications." *Mol Cell Biochem* **334**(1-2): 221-232.
- Garthwaite, J. and C. L. Boulton (1995). "Nitric oxide signaling in the central nervous system." *Annu Rev Physiol* **57**: 683-706.
- Gerlach, M., D. Blum-Degen, et al. (2001). "Expression, but not activity, of neuronal nitric oxide synthase is regionally increased in the alcoholic brain." *Alcohol Alcohol* **36**(1): 65-69.
- Groenewegen, H. J., C. I. Wright, et al. (1999). "Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs." *Ann N Y Acad Sci* **877**: 49-63.
- Guix, F. X., I. Uribesalgo, et al. (2005). "The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain." *Prog Neurobiol* **76**(2): 126-152.
- Haley, J. E., G. L. Wilcox, et al. (1992). "The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation." *Neuron* **8**(2): 211-216.
- Haracz, J. L., J. S. MacDonall, et al. (1997). "Effects of nitric oxide synthase inhibitors on cocaine sensitization." *Brain Res* **746**(1-2): 183-189.
- Heneka, M. T. and D. L. Feinstein (2001). "Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons." *J Neuroimmunol* **114**(1-2): 8-18.
- Hernandez, P. J., K. Sadeghian, et al. (2002). "Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens." *Nat Neurosci* **5**(12): 1327-1331.
- Ignarro, L. J. (1991). "Signal transduction mechanisms involving nitric oxide." *Biochem Pharmacol* **41**(4): 485-490.
- Ikemoto, S. and J. Panksepp (1999). "The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking." *Brain Res Brain Res Rev* **31**(1): 6-41.
- Introini-Collison, I. B. and J. L. McGaugh (1989). "Cocaine enhances memory storage in mice." *Psychopharmacology (Berl)* **99**(4): 537-541.
- Itzhak, Y. (1996). "Attenuation of cocaine kindling by 7-nitroindazole, an inhibitor of brain nitric oxide synthase." *Neuropharmacology* **35**(8): 1065-1073.
- Itzhak, Y. (1997). "Modulation of cocaine- and methamphetamine-induced behavioral sensitization by inhibition of brain nitric oxide synthase." *J Pharmacol Exp Ther* **282**(2): 521-527.
- Itzhak, Y., K. L. Anderson, et al. (2004). "Differential response of nNOS knockout mice to MDMA ("ecstasy")- and methamphetamine-induced psychomotor sensitization and neurotoxicity." *Ann N Y Acad Sci* **1025**: 119-128.
- Itzhak, Y., J. L. Martin, et al. (1998). "The role of neuronal nitric oxide synthase in cocaine-induced conditioned place preference." *Neuroreport* **9**(11): 2485-2488.
- Itzhak, Y., C. Roger-Sanchez, et al. (2010). "Discrimination between cocaine-associated context and cue in a modified conditioned place preference paradigm: role of the nNOS gene in cue conditioning." *Int J Neuropsychopharmacol* **13**(2): 171-180.
- Jaffrey, S. R., A. M. Snowman, et al. (1998). "CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95." *Neuron* **20**(1): 115-124.
- Javadi, S., S. Ejtemaeimehr, et al. (2013). "Pioglitazone potentiates development of morphine-dependence in mice: possible role of NO/cGMP pathway." *Brain Res* **1510**: 22-37.

- Kalivas, P. W. (2004). "Glutamate systems in cocaine addiction." *Curr Opin Pharmacol* **4**(1): 23-29.
- Kalivas, P. W. and P. Duffy (1990). "Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens." *Synapse* **5**(1): 48-58.
- Kalivas, P. W. and P. Duffy (1993). "Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. II. Dopamine perikarya." *J Neurosci* **13**(1): 276-284.
- Kalivas, P. W. and P. Duffy (1998). "Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area." *J Neurochem* **70**(4): 1497-1502.
- Kalivas, P. W., R. C. Pierce, et al. (1998). "A role for sensitization in craving and relapse in cocaine addiction." *J Psychopharmacol* **12**(1): 49-53.
- Kalivas, P. W. and J. Stewart (1991). "Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity." *Brain Res Brain Res Rev* **16**(3): 223-244.
- Kalivas, P. W. and N. D. Volkow (2005). "The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice." *Am J Psychiatry* **162**(8): 1403-1413.
- Kalivas, P. W. and B. Weber (1988). "Amphetamine injection into the ventral mesencephalon sensitizes rats to peripheral amphetamine and cocaine." *J Pharmacol Exp Ther* **245**(3): 1095-1102.
- Karatinos, J., R. B. Rosse, et al. (1995). "The nitric oxide pathway: potential implications for treatment of neuropsychiatric disorders." *Clin Neuropharmacol* **18**(6): 482-499.
- Kayir, H. and I. T. Uzbay (2004). "Evidence for the role of nitric oxide in caffeine-induced locomotor activity in mice." *Psychopharmacology (Berl)* **172**(1): 11-15.
- Kelley, A. E. (1999). "Functional specificity of ventral striatal compartments in appetitive behaviors." *Ann N Y Acad Sci* **877**: 71-90.
- Kelley, A. E. and V. B. Domesick (1982). "The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study." *Neuroscience* **7**(10): 2321-2335.
- Kelley, A. E., V. B. Domesick, et al. (1982). "The amygdalostriatal projection in the rat--an anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods." *Neuroscience* **7**(3): 615-630.
- Kim, H. S. and W. K. Park (1995). "Nitric oxide mediation of cocaine-induced dopaminergic behaviors: ambulation-accelerating activity, reverse tolerance and conditioned place preference in mice." *J Pharmacol Exp Ther* **275**(2): 551-557.
- Kiss, J. P. and E. S. Vizi (2001). "Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission." *Trends Neurosci* **24**(4): 211-215.
- Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." *Biochem J* **298** (Pt 2): 249-258.
- Knowles, R. G. and M. Salter (1998). "Measurement of NOS activity by conversion of radiolabeled arginine to citrulline using ion-exchange separation." *Methods Mol Biol* **100**: 67-73.
- Koesling, D., F. Mullershausen, et al. (2005). "Negative feedback in NO/cGMP signalling." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5): 1119-1122.
- Komsuoglu Celikyurt, I., T. Utkan, et al. (2014). "Effects of YC-1 on Learning and Memory Functions of Aged Rats." *Med Sci Monit Basic Res* **20**: 130-137.
- Kone, B. C. (2000). "Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases." *Acta Physiol Scand* **168**(1): 27-31.
- Kone, B. C., T. Kuncewicz, et al. (2003). "Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide." *Am J Physiol Renal Physiol* **285**(2): F178-190.
- Koob, G. F. (1992). "Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways." *Trends Pharmacol Sci* **13**(5): 177-184.

- Koob, G. F., S. H. Ahmed, et al. (2004). "Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence." *Neurosci Biobehav Rev* **27**(8): 739-749.
- Koob, G. F. and F. E. Bloom (1988). "Cellular and molecular mechanisms of drug dependence." *Science* **242**(4879): 715-723.
- Koob, G. F. and M. Le Moal (2008). "Addiction and the brain antireward system." *Annu Rev Psychol* **59**: 29-53.
- Koob, G. F. and E. J. Nestler (1997). "The neurobiology of drug addiction." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **9**(3): 482-497.
- Koob, G. F. and N. D. Volkow (2010). "Neurocircuitry of addiction." *Neuropsychopharmacology* **35**(1): 217-238.
- Kulkarni, S. K. and A. Dhir (2007). "Possible involvement of L-arginine-nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway in the antidepressant activity of berberine chloride." *Eur J Pharmacol* **569**(1-2): 77-83.
- Kuribara, H. (1996). "Effects of interdose interval on ambulatory sensitization to methamphetamine, cocaine and morphine in mice." *Eur J Pharmacol* **316**(1): 1-5.
- Kurt, M., S. S. Bilge, et al. (2004). "Effect of sildenafil on anxiety in the plus-maze test in mice." *Pol J Pharmacol* **56**(3): 353-357.
- Lancaster, J. R., Jr. (1994). "Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17): 8137-8141.
- Li, Y. and J. A. Kauer (2004). "Repeated exposure to amphetamine disrupts dopaminergic modulation of excitatory synaptic plasticity and neurotransmission in nucleus accumbens." *Synapse* **51**(1): 1-10.
- Lipton, S. A., Y. B. Choi, et al. (1993). "A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds." *Nature* **364**(6438): 626-632.
- Lodge, D. J. and A. A. Grace (2008). "Amphetamine activation of hippocampal drive of mesolimbic dopamine neurons: a mechanism of behavioral sensitization." *J Neurosci* **28**(31): 7876-7882.
- Loftis, J. M. and A. Janowsky (2000). "Regulation of NMDA receptor subunits and nitric oxide synthase expression during cocaine withdrawal." *J Neurochem* **75**(5): 2040-2050.
- Lowe, G. and R. Costabile (2011). "Phosphodiesterase type 5 inhibitor abuse: a critical review." *Curr Drug Abuse Rev* **4**(2): 87-94.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Mackowiak, M., M. Grzegorzewska, et al. (2008). "Cocaine decreases the expression of PSA-NCAM protein and attenuates long-term potentiation via glucocorticoid receptors in the rat dentate gyrus." *Eur J Neurosci* **27**(11): 2928-2937.
- Machelska, H., B. Ziolkowska, et al. (1997). "Chronic morphine increases biosynthesis of nitric oxide synthase in the rat spinal cord." *Neuroreport* **8**(12): 2743-2747.
- Martin, S. J., P. D. Grimwood, et al. (2000). "Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis." *Annu Rev Neurosci* **23**: 649-711.
- McCambridge, J., L. Mitcheson, et al. (2006). "The rise of Viagra among British illicit drug users: 5-year survey data." *Drug Alcohol Rev* **25**(2): 111-113.
- McFarland, K. and P. W. Kalivas (2001). "The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior." *J Neurosci* **21**(21): 8655-8663.
- Melnick, S. M., J. L. Kubie, et al. (2001). "Impairment of spatial learning following preweaning cocaine exposure in the adult rat." *Neurotoxicol Teratol* **23**(5): 445-451.
- Milman, H. A. and S. B. Arnold (2002). "Neurologic, psychological, and aggressive disturbances with sildenafil." *Ann Pharmacother* **36**(7-8): 1129-1134.
- Miller, E. K. and J. D. Cohen (2001). "An integrative theory of prefrontal cortex function." *Annu Rev Neurosci* **24**: 167-202.

- Mohn, A. R., W. D. Yao, et al. (2004). "Genetic and genomic approaches to reward and addiction." Neuropharmacology **47 Suppl 1**: 101-110.
- Moncada, S. (1997). "Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology." Ann N Y Acad Sci **811**: 60-67; discussion 67-69.
- Montague, P. R., C. D. Gancayco, et al. (1994). "Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex." Science **263**(5149): 973-977.
- Monti, M. C., L. A. Gabach, et al. (2012). "Impact of contextual cues in the expression of the memory associated with diazepam withdrawal: involvement of hippocampal PKMzeta in vivo, and Arc expression and LTP in vitro." Eur J Neurosci **36**(8): 3118-3125.
- Murad, F. (1994). "The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication." Recent Prog Horm Res **49**: 239-248.
- Musacchio, N. S., M. Hartrich, et al. (2006). "Erectile dysfunction and viagra use: what's up with college-age males?" J Adolesc Health **39**(3): 452-454.
- Mustafa, A. K., M. M. Gadalla, et al. (2009). "Signaling by gasotransmitters." Sci Signal **2**(68): re2.
- Nasif, F. J., X. T. Hu, et al. (2011). "Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents alterations in medial prefrontal cortex excitability induced by repeated cocaine administration." Psychopharmacology (Berl) **218**(2): 323-330.
- Nestler, E. J. (2001). "Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction." Nat Rev Neurosci **2**(2): 119-128.
- Nestler, E. J. (2002). "Common molecular and cellular substrates of addiction and memory." Neurobiol Learn Mem **78**(3): 637-647.
- Nestler, E. J. (2004). "Molecular mechanisms of drug addiction." Neuropharmacology **47 Suppl 1**: 24-32.
- Noonan, M. A., K. H. Choi, et al. (2008). "Withdrawal from cocaine self-administration normalizes deficits in proliferation and enhances maturity of adult-generated hippocampal neurons." J Neurosci **28**(10): 2516-2526.
- Nosten-Bertrand, M., M. L. Errington, et al. (1996). "Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1." Nature **379**(6568): 826-829.
- Nowicky, A. V. and L. J. Bindman (1993). "The nitric oxide synthase inhibitor, N-monomethyl-L-arginine blocks induction of a long-term potentiation-like phenomenon in rat medial frontal cortical neurons in vitro." J Neurophysiol **70**(3): 1255-1259.
- Nutt, D., L. A. King, et al. (2007). "Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse." Lancet **369**(9566): 1047-1053.
- O'Brien, M. S. and J. C. Anthony (2005). "Risk of becoming cocaine dependent: epidemiological estimates for the United States, 2000-2001." Neuropsychopharmacology **30**(5): 1006-1018.
- O'Dell, T. J., P. L. Huang, et al. (1994). "Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS." Science **265**(5171): 542-546.
- Orsini, C., E. Izzo, et al. (2002). "Blockade of nitric oxide synthesis reduces responding for cocaine self-administration during extinction and reinstatement." Brain Res **925**(2): 133-140.
- Palmer, R. M., D. D. Rees, et al. (1988). "L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation." Biochem Biophys Res Commun **153**(3): 1251-1256.
- Paxinos, G., C. Watson, et al. (1985). "Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight." J Neurosci Methods **13**(2): 139-143.
- Perez, M. F., L. A. Gabach, et al. (2010). "Different chronic cocaine administration protocols induce changes on dentate gyrus plasticity and hippocampal dependent behavior." Synapse **64**(10): 742-753.

- Perrotti, L. I., R. R. Weaver, et al. (2008). "Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse." *Synapse* **62**(5): 358-369.
- Piazza, P. V. and M. L. Le Moal (1996). "Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 359-378.
- Pierce, R. C., K. Bell, et al. (1996). "Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization." *J Neurosci* **16**(4): 1550-1560.
- Pierce, R. C. and P. W. Kalivas (1997). "A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants." *Brain Res Brain Res Rev* **25**(2): 192-216.
- Pogun, S., S. Demirgoren, et al. (2000). "Nicotine modulates nitric oxide in rat brain." *Eur Neuropsychopharmacol* **10**(6): 463-472.
- Post, R. M., S. R. Weiss, et al. (1988). "Cocaine-induced behavioral sensitization and kindling: implications for the emergence of psychopathology and seizures." *Ann N Y Acad Sci* **537**: 292-308.
- Prast, H. and A. Philippu (2001). "Nitric oxide as modulator of neuronal function." *Prog Neurobiol* **64**(1): 51-68.
- Pudiak, C. M. and M. A. Bozarth (1993). "L-NAME and MK-801 attenuate sensitization to the locomotor-stimulating effect of cocaine." *Life Sci* **53**(20): 1517-1524.
- Pudiak, C. M., R. KuoLee, et al. (2014). "Tolerance to cocaine in brain stimulation reward following continuous cocaine infusions." *Pharmacol Biochem Behav* **122**: 246-252.
- Pulvirenti, L., R. Maldonado-Lopez, et al. (1992). "NMDA receptors in the nucleus accumbens modulate intravenous cocaine but not heroin self-administration in the rat." *Brain Res* **594**(2): 327-330.
- Puzzo, D., S. Sapienza, et al. (2008). "Role of phosphodiesterase 5 in synaptic plasticity and memory." *Neuropsychiatr Dis Treat* **4**(2): 371-387.
- Puzzo, D., A. Staniszewski, et al. (2009). "Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model." *J Neurosci* **29**(25): 8075-8086.
- Quirk, P. L., R. W. Richards, et al. (2001). "Subchronic cocaine produces training paradigm-dependent learning deficits in laboratory rats." *Pharmacol Biochem Behav* **68**(3): 545-553.
- Rameau, G. A., L. Y. Chiu, et al. (2004). "Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor." *J Biol Chem* **279**(14): 14307-14314.
- Rameau, G. A., D. S. Tukey, et al. (2007). "Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death." *J Neurosci* **27**(13): 3445-3455.
- Rengasamy, A. and R. A. Johns (1993). "Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide." *Mol Pharmacol* **44**(1): 124-128.
- Reynolds, S. M. and K. C. Berridge (2002). "Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste "liking"/"disliking" reactions, place preference/avoidance, and fear." *J Neurosci* **22**(16): 7308-7320.
- Reznikov, K. (1975). "[Local proliferation of cells of the granular layer of the dentate gyrus of the mouse hippocampus during postnatal ontogenesis and following brain injury]." *Ontogenez* **6**(3): 242-250.
- Rezvani, A. H., D. R. Grady, et al. (1995). "Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates alcohol consumption in two strains of alcohol-preferring rats." *Pharmacol Biochem Behav* **50**(2): 265-270.

- Robinson, T. E. and J. B. Becker (1986). "Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis." *Brain Res* **396**(2): 157-198.
- Robinson, T. E. and K. C. Berridge (1993). "The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction." *Brain Res Brain Res Rev* **18**(3): 247-291.
- Robinson, T. E. and K. C. Berridge (2000). "The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view." *Addiction* **95 Suppl 2**: S91-117.
- Robinson, T. E. and K. C. Berridge (2003). "Addiction." *Annu Rev Psychol* **54**: 25-53.
- Robinson, T. E. and B. Kolb (1999). "Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine." *Eur J Neurosci* **11**(5): 1598-1604.
- Rogerio, R. and R. N. Takahashi (1992). "Anxiogenic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze." *Pharmacol Biochem Behav* **43**(2): 631-633.
- Roitman, M. F., R. A. Wheeler, et al. (2005). "Nucleus accumbens neurons are innately tuned for rewarding and aversive taste stimuli, encode their predictors, and are linked to motor output." *Neuron* **45**(4): 587-597.
- Russwurm, M., N. Wittau, et al. (2001). "Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes." *J Biol Chem* **276**(48): 44647-44652.
- Sammut, S. and A. R. West (2008). "Acute cocaine administration increases NO efflux in the rat prefrontal cortex via a neuronal NOS-dependent mechanism." *Synapse* **62**(9): 710-713.
- Santucci, A. C., S. Capodilupo, et al. (2004). "Cocaine in adolescent rats produces residual memory impairments that are reversible with time." *Neurotoxicol Teratol* **26**(5): 651-661.
- Sasaki, M., M. Gonzalez-Zulueta, et al. (2000). "Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15): 8617-8622.
- Schulman, H. (1997). "Nitric oxide: a spatial second messenger." *Mol Psychiatry* **2**(4): 296-299.
- Schuman, E. M. and D. V. Madison (1991). "A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation." *Science* **254**(5037): 1503-1506.
- Segal, D. S., M. A. Geyer, et al. (1981). "Stimulant-induced psychosis: an evaluation of animal methods." *Essays Neurochem Neuropharmacol* **5**: 95-129.
- Sequeira, S. M., A. F. Ambrosio, et al. (1997). "Modulation of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes by nitric oxide." *Nitric Oxide* **1**(4): 315-329.
- Sesack, S. R. and A. A. Grace (2010). "Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry." *Neuropsychopharmacology* **35**(1): 27-47.
- Shen, H. W., S. Toda, et al. (2009). "Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats." *J Neurosci* **29**(9): 2876-2884.
- Sinha, R. (2001). "How does stress increase risk of drug abuse and relapse?" *Psychopharmacology (Berl)* **158**(4): 343-359.
- Smith, D. A., M. Browning, et al. (1993). "Cocaine inhibits hippocampal long-term potentiation." *Brain Res* **608**(2): 259-265.
- Smith, K. M. and F. Romanelli (2005). "Recreational use and misuse of phosphodiesterase 5 inhibitors." *J Am Pharm Assoc (2003)* **45**(1): 63-72; quiz 73-65.
- Son, H., R. D. Hawkins, et al. (1996). "Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase." *Cell* **87**(6): 1015-1023.
- Sowell, E. R., P. M. Thompson, et al. (2004). "Longitudinal mapping of cortical thickness and brain growth in normal children." *J Neurosci* **24**(38): 8223-8231.
- Spear, L. P. (2000). "The adolescent brain and age-related behavioral manifestations." *Neurosci Biobehav Rev* **24**(4): 417-463.

- Stamler, J. S., S. Lamas, et al. (2001). "Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism." *Cell* **106**(6): 675-683.
- Steketee, J. D. (2005). "Cortical mechanisms of cocaine sensitization." *Crit Rev Neurobiol* **17**(2): 69-86.
- Steketee, J. D. and P. W. Kalivas (2011). "Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior." *Pharmacol Rev* **63**(2): 348-365.
- Taepavarapruk, P., S. B. Floresco, et al. (2000). "Hyperlocomotion and increased dopamine efflux in the rat nucleus accumbens evoked by electrical stimulation of the ventral subiculum: role of ionotropic glutamate and dopamine D1 receptors." *Psychopharmacology (Berl)* **151**(2-3): 242-251.
- Tahsili-Fahadan, P., N. Yahyavi-Firouz-Abadi, et al. (2006). "Rewarding properties of sildenafil citrate in mice: role of the nitric oxide-cyclic GMP pathway." *Psychopharmacology (Berl)* **185**(2): 201-207.
- Teyler, T. J. and P. DiScenna (1987). "Long-term potentiation." *Annu Rev Neurosci* **10**: 131-161.
- Thomas, M. J. and R. C. Malenka (2003). "Synaptic plasticity in the mesolimbic dopamine system." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1432): 815-819.
- Thompson, A. M., B. A. Gosnell, et al. (2002). "Enhancement of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine exposure." *Neuropharmacology* **42**(8): 1039-1042.
- Thompson, A. M., J. Swant, et al. (2004). "Modulation of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine self-administration." *Neuroscience* **127**(1): 177-185.
- Uthayathas, S., S. S. Karuppagounder, et al. (2007). "Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications." *Pharmacol Rep* **59**(2): 150-163.
- Vanderschuren, L. J. and P. W. Kalivas (2000). "Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies." *Psychopharmacology (Berl)* **151**(2-3): 99-120.
- Venhuis, B. J., L. Blok-Tip, et al. (2008). "Designer drugs in herbal aphrodisiacs." *Forensic Sci Int* **177**(2-3): e25-27.
- Venhuis, B. J. and D. de Kaste (2008). "Sildenafil analogs used for adulterating marihuana." *Forensic Sci Int* **182**(1-3): e23-24.
- Vorel, S. R., X. Liu, et al. (2001). "Relapse to cocaine-seeking after hippocampal theta burst stimulation." *Science* **292**(5519): 1175-1178.
- Wallace, D. M., D. J. Magnuson, et al. (1992). "Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic, and adrenergic cell groups in the rat." *Brain Res Bull* **28**(3): 447-454.
- Wang, Y., D. C. Newton, et al. (1999). "Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance." *Crit Rev Neurobiol* **13**(1): 21-43.
- Weruaga, E., B. Balkan, et al. (2002). "Effects of chronic nicotine administration on nitric oxide synthase expression and activity in rat brain." *J Neurosci Res* **67**(5): 689-697.
- West, A. R., M. P. Galloway, et al. (2002). "Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms." *Synapse* **44**(4): 227-245.
- White, F. J., X. T. Hu, et al. (1995). "Repeated administration of cocaine or amphetamine alters neuronal responses to glutamate in the mesoaccumbens dopamine system." *J Pharmacol Exp Ther* **273**(1): 445-454.
- Whitlock, J. R., A. J. Heynen, et al. (2006). "Learning induces long-term potentiation in the hippocampus." *Science* **313**(5790): 1093-1097.
- Wise, R. A. (2004). "Dopamine, learning and motivation." *Nat Rev Neurosci* **5**(6): 483-494.
- Wolf, M. E. (2002). "Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways." *Mol Interv* **2**(3): 146-157.
- Wolf, M. E. (2003). "LTP may trigger addiction." *Mol Interv* **3**(5): 248-252.
- Wolf, M. E. (2010). "The Bermuda Triangle of cocaine-induced neuroadaptations." *Trends Neurosci* **33**(9): 391-398.

- Wolf, M. E., S. L. Dahlin, et al. (1995). "Effects of lesions of prefrontal cortex, amygdala, or fornix on behavioral sensitization to amphetamine: comparison with N-methyl-D-aspartate antagonists." Neuroscience **69**(2): 417-439.
- Wu, M., S. M. Brudzynski, et al. (1993). "Functional interaction of dopamine and glutamate in the nucleus accumbens in the regulation of locomotion." Can J Physiol Pharmacol **71**(5-6): 407-413.
- Yamaguchi, M., T. Suzuki, et al. (2002). "Repeated cocaine administration differentially affects NMDA receptor subunit (NR1, NR2A-C) mRNAs in rat brain." Synapse **46**(3): 157-169.
- Yamaguchi, M., T. Suzuki, et al. (2005). "Decreased cell proliferation in the dentate gyrus of rats after repeated administration of cocaine." Synapse **58**(2): 63-71.
- Yoo, J. H., J. H. Cho, et al. (2006). "Differential effects of morphine- and cocaine-induced nNOS immunoreactivity in the dentate gyrus of hippocampus of mice lacking mu-opioid receptors." Neurosci Lett **395**(2): 98-102.
- Young, C. D. and A. Y. Deutch (1998). "The effects of thalamic paraventricular nucleus lesions on cocaine-induced locomotor activity and sensitization." Pharmacol Biochem Behav **60**(3): 753-758.
- Yun, H. Y., V. L. Dawson, et al. (1996). "Neurobiology of nitric oxide." Crit Rev Neurobiol **10**(3-4): 291-316.
- Zahm, D. S. and J. S. Brog (1992). "On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum." Neuroscience **50**(4): 751-767.

R-T

615.73

Gabach, Laura Alejandra

G

El oxido nítrico

12632



12632

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.