

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFECTO DE LA EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA A ANFETAMINA EN LA
EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN CAMBIOS PLÁSTICOS
NEURONALES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE LA
SENSIBILIZACIÓN CONDUCTUAL EN RATAS WISTAR.**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas para optar por el grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular.

VILMA ROJAS GARBANZO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Dedicatoria

A mi mamá y mi papá por ser mi bastón en cada uno de mis pasos.

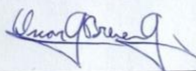
A mi hermana y mejor amiga Caro. Visualizamos ilusionadas compartir este momento, la vida no nos dejó disfrutarlo físicamente, pero nada nos va a impedir celebrarlo en espíritu.

Mi ejemplo a seguir como persona y como científica. Mi mejor compañía y cómplice en vida y para siempre en mi corazón.

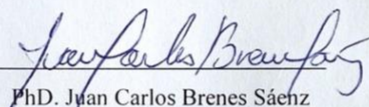
Agradecimientos

Las principales lecciones que me deja esta maestría no son académicas sino de vida. Después de mucho tiempo, culminar este proceso me llena de un profundo sentimiento de gratitud hacia muchas personas que me tendieron una mano para levantarme en los momentos difíciles que acompañaron estos años y para acompañarme en las experiencias lindas y gratificantes también. En primer lugar, agradezco a mi familia: mami, papi, Raúl, Maria, Caro, Roy, Orlan y mis sobrinos. Sin nuestra unión familiar, sus consejos y su amor no estaría hoy culminando esta etapa, a todos los admiro muchísimo y son mi motor de vida. A Mau y So, mis grandes amigas, por su apoyo, su preocupación, su cariño y por la energía positiva que aportan a mi vida y que me motiva a seguir. A las nuerochicas, por enseñarme el significado de la palabra sororidad, por ser un ejemplo de lucha y de perseverancia las admiro muchísimo. A mis compañeros de UCIMED: Dani, Silvi y Nacho, por enseñarme sobre el compañerismo, por su paciencia, por acompañarme día a día en este proceso y no dejarme “aflojar”. A David, por enseñarme sobre la incondicionalidad y la resiliencia, por ser un compañero increíble y ayudarme a levantarme para culminar esta tesis, en el momento más duro de mi vida. A los investigadores y miembros del Centro de Investigación en Neurociencias, por su apoyo todo este tiempo en cada una de mis actividades en el Centro. Al Instituto de Investigaciones en Salud, por la disposición de sus recursos para la realización de mi trabajo de graduación. A mi comité asesor, el profe Jaime, Andrey y Juan Ca gracias por sus consejos, enseñanzas y paciencia.

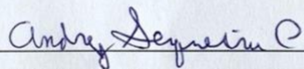
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular”



Dr. Oscar Brenes García
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado

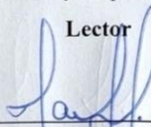


PhD. Juan Carlos Brenes Sáenz
Director de tesis



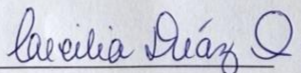
PhD. Andrey Sequeira Cordero

Lector



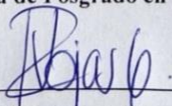
PhD. Jaime Fornaguera Trias

Lector



Dra. Cecilia Díaz Oreiro

Directora Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas



Vilma Rojas Garbanzo

Sustentante

Tabla de Contenidos:

<i>Dedicatoria</i>	<i>ii</i>
<i>Resumen</i>	<i>vi</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>vii</i>
<i>Índice de tablas</i>	<i>ix</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>x</i>
<i>Licencia de publicación</i>	<i>xii</i>
1 <i>Introducción</i>	1
1.1 Panorama general	1
1.2 Modelos animales de dependencia	3
1.2.1 Condicionamiento de Preferencia de Lugar	3
1.2.2 Modelo de Autoadministración de la Droga	4
1.2.3 Modelo de recaída	5
1.2.4 Incubación de la sensibilidad conductual	5
1.3 Psicofarmacología de la amfetamina	6
1.3.1 Aumento de la concentración de DA en la hendidura sináptica y la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas	7
1.3.2 Aumento en las concentraciones de noradrenalina y serotonina	9
1.4 Mecanismos de plasticidad inducidos por psicoestimulantes	9
1.4.1 Cambios en la plasticidad estructural tras el consumo de psicoestimulantes	10
1.4.2 Cascadas de señalización y plasticidad asociadas con amfetamina	12
1.4.3 Integración de las cascadas de señalización y plasticidad asociadas con amfetamina	22
2 <i>Justificación</i>	24
3 <i>Hipótesis</i>	26
4 <i>Objetivos</i>	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos específicos	26
5 <i>Materiales y métodos</i>	27
5.1 Animales	27
5.2 Diseño experimental	27
5.3 Prueba de Campo abierto	29
5.4 Extracción de ARN y transcripción reversa	29
5.5 PCR en tiempo real	30
5.6 Análisis de los datos	31
6 <i>Resultados</i>	33
6.1 Actividad locomotora	33
6.1.1 Actividad anticipatoria condicionada	33

6.1.2	Actividad locomotora inducida por la anfetamina	35
6.2	Expresión génica	38
6.2.1	Hipocampo:	38
6.2.2	Núcleo accumbens:	39
6.2.3	Estriado dorsal:	40
6.3	Correlaciones	41
6.3.1	Correlaciones entre la expresión de los genes en estudio	41
6.3.2	Correlaciones entre la conducta de los animales y la expresión génica por área cerebral	43
7	Discusión	44
8	Conclusiones	69
9	Recomendaciones	70
10	Referencias	72

Resumen

El modelo de incubación de la sensibilidad conductual ha sido utilizado para estudiar los cambios que ocurren tras la administración repetida de una droga de abuso, con el fin de explicar, al menos en parte, los mecanismos involucrados en la transición del consumo esporádico o recreacional a un consumo compulsivo o adictivo. Sin embargo, en lo referente al consumo de anfetamina, no se tiene claro aún cuáles son los genes cuyos productos funcionales podrían orquestrar los cambios estructurales a nivel neuronal que permiten esta transición, y que incrementan la posibilidad de recaída tras periodos de retiro de la droga.

Es por esto que este trabajo pretende aportar información sobre cómo etapas particulares del desarrollo de la dependencia, como la incubación de la sensibilidad conductual, provoca cambios en los niveles del ARN mensajero (ARNm) de genes cuyos productos funcionales participan en vías celulares con un importante papel en la plasticidad estructural (ej., TrkB, BDNF, CREB, p250GAP, cofilina 1 y Arp2), en tres áreas cerebrales de ratas Wistar tras la exposición subcrónica a anfetamina. Además, se busca ampliar la información sobre la sensibilización de conductas evaluadas en pruebas como el campo abierto (ej., locomoción) ante la misma condición, ya que la locomoción es la conducta que usualmente se utiliza en la literatura como indicador del desarrollo de la sensibilidad y su incubación.

Índice de figuras

- Figura 1* **Porcentaje de personas que ha consumido cocaína alguna vez en la vida en Costa Rica.**
- Figura 2* **Edad media en la que las personas consumieron por primera vez cocaína en Costa Rica.**
- Figura 3* **Estructura química de la dopamina y la anfetamina.**
- Figura 4* **Mecanismos generales de acción farmacológica de la anfetamina en la hendidura sináptica.**
- Figura 5* **Vías de señalización intracelulares iniciadas por la activación del receptor TrkB.**
- Figura 6* **Vías de señalización que activan la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc.**
- Figura 7* **Ensamblado y ciclo de la actina y efectos del factor despolarización de la actina y cofilina.**
- Figura 8* **Integración de la actividad de moléculas participantes en cascadas de señalización en respuesta al consumo de anfetamina.**
- Figura 9* **Estrategia metodológica.**
- Figura 10* **Actividad anticipatoria condicionada en la fase de desarrollo de la sensibilización conductual.**
- Figura 11* **Actividad anticipatoria condicionada en la expresión de la incubación de la sensibilización conductual.**
- Figura 12* **Actividad locomotora inducida por la anfetamina en la fase de desarrollo de la sensibilización conductual.**
- Figura 13* **Actividad locomotora inducida por la anfetamina en la fase de expresión de la incubación de la sensibilización conductual.**
- Figura 14* **Expresión génica en hipocampo.**
- Figura 15* **Expresión génica en núcleo accumbens.**

Figura 16 Expresión génica en estriado dorsal.

Figura 17 Componentes del proceso de aprendizaje asociativo identificados en el protocolo experimental.

Figura 18 Efectos del tiempo de emparejamiento entre el contexto y los efectos recompensantes del fenómeno.

Figura 19 Neurocircuito involucrado en la sensibilización conductual

Figura 20 Principales resultados obtenidos sobre la expresión de los genes de interés en las tres áreas cerebrales de estudiadas

Índice de tablas

- Tabla 1* *Secuencias de los primers y temperaturas de annealing para las reacciones de amplificación por PCR en tiempo real.*
- Tabla 2* *Variaciones en la expresión génica de los genes de interés según el área cerebral analizada.*
- Tabla 3* *Correlaciones entre la expresión de los genes en estudio según el área cerebral y tratamiento.*

Abreviaturas

5-HT:	<i>Serotonina</i>
ABPs:	<i>Proteínas de unión a la actina</i>
ADF:	<i>Factor de despolarización de la actina</i>
AMPA:	<i>Ácido amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico</i>
ATV:	<i>Área tegmental ventral</i>
BDNF:	<i>Factor de crecimiento derivado del cerebro</i>
CA:	<i>Campo abierto</i>
CflI:	<i>Cofilina 1</i>
CIN:	<i>Centro de Investigación en Neurociencias</i>
CICUA:	<i>Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales</i>
CPFm:	<i>Corteza prefrontal medial</i>
CRE:	<i>Elemento de respuesta al AMPc</i>
CREB:	<i>Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc</i>
CREBp:	<i>Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc fosforilada</i>
CRF:	<i>Factor liberador de corticotropina</i>
DA:	<i>Dopamina</i>
DAT:	<i>Transportador de dopamina</i>
DLP:	<i>Depresión a largo plazo</i>
DPN:	<i>Día postnatal</i>
EAAT3:	<i>Transportador de aminoácidos excitatorios</i>
Ed:	<i>Estriado dorsal</i>
Glu:	<i>Glutamato</i>
Hip:	<i>Hipocampo</i>
IAFA:	<i>Instituto sobre Alcoholismo y Farmacodependencia</i>
IIP:	<i>Instituto de Investigaciones Psicológicas</i>
INISA:	<i>Instituto de Investigaciones en Salud</i>
LEBi	<i>Laboratorio de Ensayos Biológicos</i>
MAO:	<i>Enzima monoamino oxidasa</i>
MAPK:	<i>Proteín quinasas activadas por mitógenos</i>
NAc:	<i>Núcleo accumbens</i>

NA: *Noradrenalina*
NMDA: *N-metil-D-aspartato*
NAT: *Transportador de noradrenalina*
ONUDD: *Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito*
PI3K: *Fosfatidil inositol tres quinasa*
PLC γ : *Fosfolipasa C gamma*
PLP: *Potenciación a largo plazo*
SERT: *Transportador de serotonina*
TrkB: *Receptor tirosín quinasa relacionado con tropomiosina*
UCR: *Universidad de Costa Rica*



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Vilma Rojas Garbanzo, con cédula de identidad 304500119, en mi condición de autor del TFG titulado Efecto de la exposición subcrónica a anfetamina en la expresión de genes involucrados en cambios plásticos neuronales relacionados con el desarrollo de la sensibilización conductual en ratas Wistar Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Vilma Rojas Garbanzo
Número de Carné: 828901 Número de cédula: 304500119
Correo Electrónico: rojasvil@gmail.com
Fecha: 25/09/2020 Número de teléfono: 8385-2800
Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Juan Carlos Brenes Sáenz

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1 Introducción

1.1 Panorama general

La dependencia puede ser definida como una conducta compulsiva hacia el consumo de drogas, junto con la ocurrencia de síntomas de abstinencia cuando el consumo es interrumpido por un periodo de tiempo (Roberts & Koob, 1997). Esta condición implica una afectación no solamente para la persona que hace un uso compulsivo de sustancias psicoactivas, sino también para sus familias, las comunidades y la sociedad en general (Vocci & Ling, 2005). Dentro de los datos más relevantes del consumo de psicoestimulantes a nivel mundial, la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (ONUDD) situó en el 2011 a las sustancias de abuso de tipo anfetamínico como el segundo tipo de droga ilegal más utilizado después del cannabis (ONUDD, 2011).

La ONUDD también reporta que algunos países de América Central presentan prevalencias altas del uso de sustancias pertenecientes al grupo de las anfetaminas. El Salvador, por ejemplo, tiene una prevalencia del 3,3%, seguido de Belice con un 1,4% y Costa Rica con un 1,3%. Además, se reporta que el consumo de preparaciones que contienen sustancias psicoestimulantes va en aumento en la región (ONUDD, 2011). Particularmente en Costa Rica, la VI Encuesta Nacional sobre Consumo de Drogas en Población General (2015) del Instituto sobre Alcoholismo y Farmacodependencia (IAFA), demostró que el consumo de psicoestimulantes ha aumentado en comparación con los años anteriores, a pesar de que su prevalencia (i.e., si ha consumido alguna vez en la vida) es baja para la población general. Dicha encuesta no cuenta con datos de consumo de anfetamina, sin embargo, incluye información relevante sobre otros psicoestimulantes como la cocaína, donde se explica que para el año 1990 el consumo de esta droga era de 0,5% y para el 2015 de 5,2% (Madrigal & Chacón, 2012) (Fig. 1). Además, los datos indican que al menos 1,1% de las personas encuestadas aceptan haberla consumido en el último año (Fig. 2), y que la edad del primer consumo ronda alrededor de los 20 años (Madrigal & Chacón, 2012).

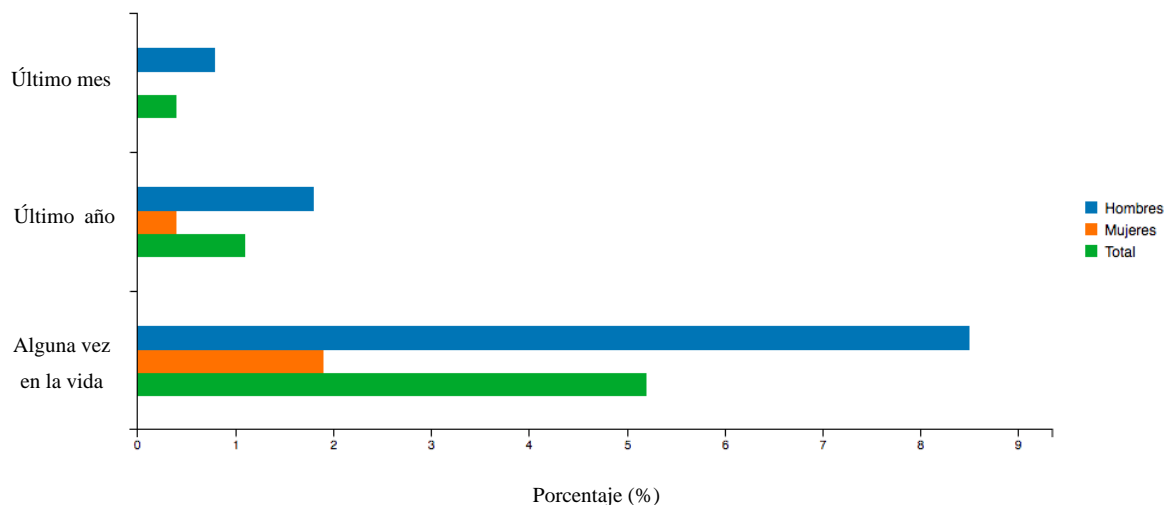


Figura. 1. Porcentaje de personas que han consumido cocaína alguna vez en la vida, en el último año o en el último mes del 2015. Fuente: VI Encuesta Nacional sobre Consumo de Drogas en Población General 2015, IAFA.

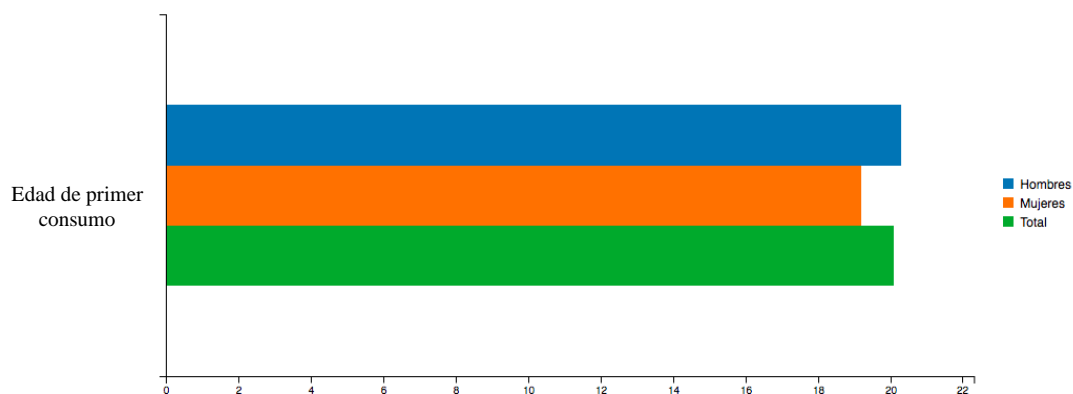


Figura. 2. Edad media en que las personas consumieron por primera vez cocaína por sexo. Fuente: VI Encuesta Nacional sobre Consumo de Drogas en Población General 2015, IAFA.

La evidencia recopilada hasta el momento sugiere que el uso y dependencia de sustancias psicoactivas no solo es un problema a nivel nacional, sino que se ha convertido en un problema regional y mundial (ONNUD, 2011). Esta información sustenta el gran valor que tiene el estudio de la neurobiología de la dependencia a este tipo de sustancias.

1.2 Modelos animales de dependencia

Es importante tomar en consideración que el uso compulsivo de sustancias psicoactivas no es el resultado obligatorio de haber iniciado un consumo ocasional de una sustancia. De hecho, solo un 20% de las personas que utilizan sustancias psicoactivas van a pasar de un uso controlado a un uso compulsivo (Badiani et al., 2011). Es por esto que se ha tratado de desarrollar modelos animales para estudiar e identificar los mecanismos de riesgo y vulnerabilidad implicados en esta transición, al tiempo que se pueden identificar posibles blancos de tratamiento para prevenir, amortiguar o revertir la dependencia de sustancias psicoactivas y sus consecuencias para la salud (Lynch, Nicholson, Dance, Morgan, & Foley, 2010).

Los estudios en animales de laboratorio han tenido una función crucial en el entendimiento de la biología y la patofisiología de las distintas etapas de la dependencia a sustancias (Lynch et al., 2010). A continuación, se describen algunos de los modelos más utilizados en la investigación en el tema de uso compulsivo, enfocados principalmente en su aplicación en roedores, así como el modelo de particular interés para este proyecto: la incubación de la sensibilidad conductual.

1.2.1 Condicionamiento de Preferencia de Lugar

Este es un modelo de condicionamiento clásico en el cual se estudian los procesos de aprendizaje asociativo que permiten que claves contextuales sean asociadas con las propiedades recompensantes de las drogas y, a su vez, explica cómo estas claves adquieren la capacidad de evocar y potenciar la búsqueda y el consumo de las sustancias de abuso (Gardner, 2005). Existen muchas variaciones en el procedimiento, pero en general, tras la administración de los psicoestimulantes, los animales son inmediatamente colocados en uno de dos compartimentos de la cámara experimental. Cada compartimento tiene diferentes pistas visuales o táctiles que facilitan el proceso asociativo con los efectos de la droga (Köks, 2015). El tiempo de permanencia del animal en el compartimento asociado con la droga provee una medición directa del efecto reforzador condicionado, lo que indica que el animal prefiere el ambiente asociado con los efectos de las drogas (Köks, 2015). Este procedimiento ha probado ser una herramienta efectiva para evaluar parámetros que afectan o participan en

el aprendizaje inicial del contexto asociado a la droga, o bien, parámetros que afecten o determinen los comportamientos posteriores al desarrollo de este aprendizaje (Carmichael & Lockhart, 2012). Sin embargo, también se ha utilizado para evaluar efectos aversivos de las drogas de abuso (Huston et al., 2013).

1.2.2 Modelo de Autoadministración de la Droga

Este modelo de condicionamiento instrumental fue desarrollado con la finalidad de estudiar los mecanismos que controlan la conducta de administración de la droga (Gardner, 2005). Se han evaluado varias formas de autoadministración incluyendo la oral, la intragástrica, la intraperitoneal, la intravenosa y la intracerebral (O'Brien & Gardner, 2005). Bajo este procedimiento de autoadministración, los animales despliegan una conducta, como presionar una palanca, que provoca la administración de una dosis de la droga que refuerza la conducta de palanqueo (Panlilio & Goldberg, 2009). Los efectos recompensantes de la droga aumentarán la probabilidad de que posteriormente los animales repitan dicho comportamiento, lo cual tiene similitud funcional con otros reforzadores como los alimentos. De esta forma, la autoadministración se estudia como una respuesta operante reforzada por los efectos de la droga, es decir, una respuesta en función de un estímulo en este caso la sustancia de abuso. Así, se puede obtener información sobre los factores que influyen en la dependencia y sobre potenciales tratamientos (Panlilio & Goldberg, 2009). Los protocolos utilizados bajo este paradigma pueden variar considerablemente según los programas de reforzamiento utilizados. Los más comunes son los programas de razón (lo que refiere a la cantidad de veces que un individuo realiza una conducta para que se le provea la droga) o programas de intervalo (en los que lo importante es el tiempo transcurrido desde el último reforzamiento). A su vez, estos programas pueden ser variables o fijos (O'Brien & Gardner, 2005). El protocolo de razón fija es el más común. Bajo este esquema, el animal recibe, ya sea la droga (en experimentos de autoadministración intravenosa), o acceso a la droga (durante experimentos de autoadministración oral) acorde a la respuesta emitida por el animal (por ejemplo, activación de una prensa de palanca o tocar con la nariz un activador un número de veces determinado y constante) (O'Brien & Gardner, 2005).

1.2.3 Modelo de recaída

Este paradigma permite estudiar los comportamientos de búsqueda y consumo de la droga durante etapas de abstinencia (Gardner, 2005). Uno de los principales problemas en relación con la dependencia es la recaída, la cual puede estar asociada con una reexposición a la droga, con la asociación de la droga con claves contextuales o con ciertos agentes estresantes (Bossert et al 2013; Shaham et al, 2003). En términos generales, los animales son entrenados para autoadministrarse la sustancia, luego se les restringe el consumo y finalmente se les presentan distintas condiciones que puedan propiciar la recaída en el comportamiento de búsqueda y/o autoadministración (Gardner, 2005). Se han desarrollado también modelos que introducen la metodología del condicionamiento de preferencia de lugar como una combinación de protocolos que aportan más información con respecto a los efectos de la droga en estudio (Shaham et al., 2003).

1.2.4 Incubación de la sensibilidad conductual

La sensibilización se entiende como el aumento en los efectos farmacológicos de la droga ante administraciones sucesivas, siendo un efecto característico para drogas psicoestimulantes como la cocaína y las anfetaminas (Roberts, Morgan, & Liu, 2007). Uno de los elementos esenciales del estudio de la sensibilización inducida por drogas psicoestimulantes es que permite entender la transición del consumo casual al compulsivo, generando información sobre los mecanismos neuronales y neuroadaptativos involucrados en estas etapas. Lo anterior puede ayudar a determinar cómo se desarrolla el abuso de drogas, cómo se mantiene el consumo y cómo se podría prevenir (Paul Vezina, 2004).

El modelo animal más utilizado y considerado el estándar de oro en el estudio de la sensibilidad es la medición de la actividad locomotora en el campo abierto a lo largo de administraciones repetidas (y en ocasiones intermitentes) de la sustancia de abuso, incluyendo un periodo de retiro de la sustancia (Roberts et al., 2007). El aumento en la locomoción del animal posterior a la administración repetida de la droga se define como sensibilización conductual y se considera un parámetro indicador de la conducta de búsqueda (Steketee & Kalivas, 2011). Adicionalmente el incremento en la actividad locomotora tras el

periodo de retiro se considera evidencia de incubación de dicha sensibilidad conductual (Phillips et al., 2011).

Se ha propuesto que las bases neurobiológicas de la sensibilización conductual a los psicoestimulantes pueden ser estudiadas en dos componentes temporales definidos como lo son la iniciación y la expresión de la sensibilización (Kalivas et al., 1993). La iniciación se refiere a los cambios moleculares y celulares progresivos que culminan en una alteración permanente del procesamiento del estímulo farmacológico (estos cambios son transitorios y puede que no se presenten hasta tiempo después de un periodo de abstinencia) (Vanderschuren & Kalivas, 2000). La expresión, por su parte, se refiere a los efectos duraderos que llevan a cambios en la conducta y que pueden ser observados incluso hasta un año después del tratamiento con la droga (Kalivas et al., 1993; Steketee & Kalivas, 2011; Vanderschuren & Kalivas, 2000). Este paradigma permite el estudio de múltiples factores como el efecto de la cantidad de dosis administradas, de los intervalos entre las dosis, del sexo, la edad y la genética de los animales según el protocolo que se propone en cada investigación.

1.3 Psicofarmacología de la anfetamina

Las anfetaminas se derivan de la planta *Ephedra sinica* y sus derivados han sido utilizados con propósitos medicinales a lo largo de mucho tiempo. Los procesos farmacológicos modernos permitieron la síntesis de la anfetamina por primera vez alrededor del año 1887 (Pryor & Storer, 2013). Las anfetaminas son agonistas monoaminérgicas, estructuralmente descritos como fenilisopropilaminas, con estructura química semejante a las catecolaminas (Fig. 3). Las dos anfetaminas más utilizadas y de donde derivan las drogas más modernas de este grupo son el sulfato de d-anfetamina y el sulfato de anfetamina racémica (Robledo, 2008).

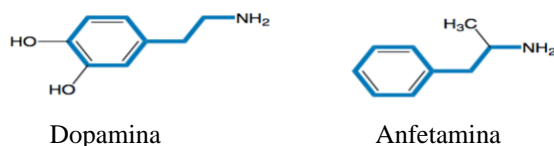


Figura. 3. Estructura química de la catecolamina dopamina (DA) y del psicoestimulante anfetamina.

Adaptado de Flenkestein et al, 2005.

Se catalogan como drogas psicoestimulantes capaces de reducir los umbrales de alerta o de vigilia, de modo que el individuo responde con más facilidad o prontitud a estímulos exógenos y/o endógenos (Fernández-Espejo, 2006; Miranda et al., 2011). Producen sensación de alerta, estimulación del sistema nervioso central, mejoría del rendimiento intelectual y de la ejecución de tareas manuales, sensación de energía, disminución del apetito, a la vez que tienen un gran potencial para inducir dependencia (Robledo, 2008).

Dentro de los mecanismos celulares que median sus efectos fisiológicos, se incluye su acción sobre la concentración de varios neurotransmisores como la DA, la serotonina (5-HT) y la noradrenalina (NA) (Robledo, 2008). Además, su actividad simpaticomimética, que se caracteriza por una estimulación indirecta del sistema nervioso simpático (Fernández-Espejo, 2006; Utrilla, 2000).

1.3.1 Aumento de la concentración de DA en la hendidura sináptica y la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas

El consumo de anfetamina modula la actividad del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (donde se incluyen áreas cerebrales como el núcleo accumbens (NAc), la corteza prefrontal (CP), estriado dorsal (Ed), amígdala (Amg) y área tegmental ventral (ATV)), produciendo un aumento en la concentración de DA en la hendidura sináptica, lo que a su vez modula diversos procesos en otras áreas del sistema límbico como el hipocampo (Hip), hipotálamo y el núcleo de la estría terminal (Badiani et al., 2011; Phillips et al., 2008; Utrilla, 2000). El aumento en la concentración de DA puede producirse tanto por el bloqueo de su recaptura, como por un aumento en su liberación (Badiani et al., 2011; Fleckenstein et al., 2007; Miranda et al., 2011; Phillips et al., 2008; Robledo, 2008; Utrilla, 2000). Las moléculas de anfetamina, al entrar en el botón terminal de la neurona presináptica, ya sea a través del transportador de DA (DAT) (Stahl, 2013) o por sus propiedades lipofílicas (Fleckenstein et al., 2007), inducen el colapso del gradiente de protones del transportador vesicular de monoaminas (VMAT2), lo que lleva a la liberación de la DA de sus vesículas de almacenamiento (Robledo, 2008; Stahl, 2013; Sulzer et al., 1995; Zarranz et al., 2011). Por otro lado, la anfetamina bloquea la enzima monoamino oxidasa (MAO) una de las

responsables de la degradación intracelular de las monoaminas, lo cual permite que los niveles citoplasmáticos de DA se mantengan elevados por más tiempo (Sulzer et al., 1995).

El aumento en la concentración del neurotransmisor a nivel citosólico permite el funcionamiento inverso de los transportadores de DA ubicados en la membrana plasmática. (Sulzer et al., 1995; Teixeira-Gomes et al., 2015). Por su similitud estructural a la DA, se cree que la anfetamina sustituye al neurotransmisor en el sitio activo del DAT a nivel extracelular, lo cual impulsa el transportador a la cara interna de la membrana plasmática dejando libre el sitio de unión para la DA citoplasmática, lo que permite que sea liberada a la cara externa de forma independiente de la concentración de calcio intracelular y más bien dependiente del gradiente de concentración del neurotransmisor, ahora invertido (Kahlig et al., 2005; Sulzer et al., 1995).

Aunado a esto, la anfetamina también funciona como un inhibidor competitivo de la recaptura de la DA extracelular. La similitud entre la DA y la anfetamina hace que ambos compitan por el sitio de unión extracelular del DAT, lo que reduce la tasa de recaptación del neurotransmisor (Fleckenstein et al., 2007). Todos estos mecanismos permitirán mantener los niveles extracelulares de DA aumentados y se resumen en la figura 4.

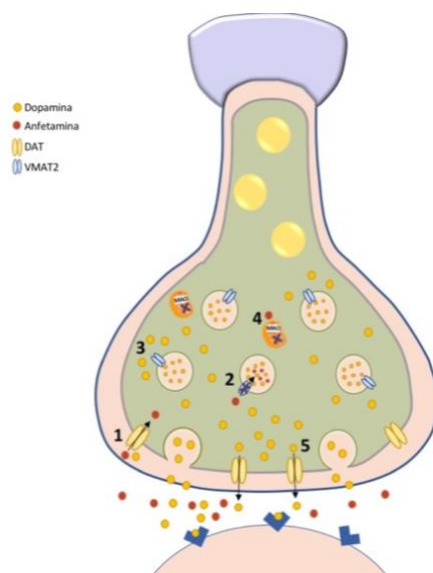


Figura. 4. Mecanismos generales de acción farmacológica de la anfetamina en la hendidura sináptica dopaminérgica. 1) Entrada de la anfetamina por el transportador de dopamina (DAT), 2) Acción sobre el transportador vesicular de monoaminas (VMAT2), 3) Liberación de la dopamina (DA) de las vesículas, 4)

Inactivación de la enzima monoamino oxidasa (MAO), 5) acción reversa del DAT. Adaptado de Teixeira-Gomes et al, 2014.

La anfetamina también genera una hiperfunción de las neuronas dopaminérgicas a partir de cambios en la señalización glutamatérgica. La modulación de la señalización glutamatérgica causada por la anfetamina involucra dos mecanismos: 1) la endocitosis del transportador de aminoácidos excitatorios (EAAT3) en las neuronas dopaminérgicas (aumentando así los niveles de glutamato (Glu) en la hendidura sináptica) (Underhill et al., 2014); y 2) la disminución de la actividad de los potenciales postsinápticos inhibitorios en neuronas dopaminérgicas mediados por los receptores metabotrópicos de Glu, los cuales tienen una participación importante en el patrón de liberación de DA (Ferraguti & Shigemoto, 2006). Esto llevará a un aumento de la liberación física de este neurotransmisor (Paladini et al., 2001). Se cree que hay una actividad sinérgica entre el aumento en las concentraciones extracelulares de DA y el aumento en la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas, mediada por un aumento del Glu en la hendidura sináptica que llevarán a una mayor excitabilidad de la neurona postsináptica.

1.3.2 Aumento en las concentraciones de noradrenalina y serotonina

Al igual que los DAT, los transportadores de NA (NAT) y 5-HT (SERT) median la recaptación sináptica de estos neurotransmisores tras su liberación vesicular (Dipace et al., 2006). Ambos transportadores son también blanco celular de la anfetamina (Sofuoglu & Sewell, 2009), por lo que tiene un efecto sobre la recaptura de estos dos neurotransmisores (Rothman et al., 2001; Schmidt & Weinshenker, 2014; Stahl, 2013; Utrilla, 2000), aunque con menor afinidad por el NAT y SERT que por el DAT (Sofuoglu & Sewell, 2009). Además, la acción de la anfetamina sobre el VMAT2 y la MAO hace que las concentraciones de NE y 5-HT tanto a nivel intracelular, como en la hendidura sináptica, se eleven de la misma manera que sucede con la DA.

1.4 Mecanismos de plasticidad inducidos por psicoestimulantes

Las manifestaciones de la dependencia a la anfetamina se asocian con cambios en la función y estructura de las neuronas, como una respuesta del sistema nervioso a los efectos de la

droga. Estos cambios neuronales pueden modular la respuesta inicial de una persona a un fármaco, el incremento a largo plazo del deseo por consumir y la propensión a las recaídas después de periodos de abstinencia (Roberts & Koob, 1997). De hecho, los cambios a nivel cerebral se han relacionado con fenómenos conductuales, que podrían estar involucrados en la transición del consumo controlado a la dependencia (Ferrario et al., 2005b).

La reorganización funcional y estructural es una propiedad intrínseca del sistema nervioso central, que permite adaptaciones a los cambios en el medio ambiente externo e interno (May, 2011). Los cambios o reordenamientos de los circuitos neuronales producto del consumo de amfetamina, pueden ocurrir por distintos mecanismos que afectan la plasticidad neuronal, lo que puede involucrar cambios en la eficiencia de los contactos neuronales ya existentes (ejemplo de ello son los procesos de potenciación y depresión a largo plazo -PLP y DLP, respectivamente), en la formación de nuevas sinapsis o en la eliminación de las ya existentes, cambios más complejos a nivel estructural en la arborización dendrítica y axonal y en la producción de neuromoduladores o neurohormonas para modificar la señalización (Hyman & Malenka, 2001; Sale et al., 2014). Más específicamente, la plasticidad estructural es un concepto que se entiende como los cambios a nivel morfológico (e.g., reemplazo neuronal, remodelación dendrítica y recambio sináptico) (McEwen et al., 2012) como respuesta, en este caso, al consumo de la droga e involucra tres elementos de la estructura neuronal: 1) densidad de espinas dendríticas, 2) forma y tamaño de las espinas dendríticas y 3) complejidad de la arborización dendrítica (Golden & Russo, 2012).

1.4.1 Cambios en la plasticidad estructural tras el consumo de psicoestimulantes

Numerosos grupos han demostrado que la administración crónica de casi todas las drogas de abuso y especialmente los psicoestimulantes, inducen cambios estructurales en el circuito de recompensa del cerebro (Robinson & Kolb, 2004; Russo et al., 2010). En estudios en roedores, una de las áreas cerebrales más estudiadas es la corteza prefrontal medial (CPFm), donde los psicoestimulantes como la amfetamina y la cocaína, inducen un aumento en la cantidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales (Crombag, Gorny, Li, Kolb, & Robinson, 2005; Ferrario et al., 2005; Robinson & Kolb, 1997; Singer et al., 2009). De hecho, estos efectos se han replicado utilizando dosis desde 0,1 mg/Kg hasta 8 mg/Kg de amfetamina,

administradas diariamente en periodos desde 14 hasta 28 días (Crombag et al., 2005; Ferrario et al., 2005; Robinson & Kolb, 1997; Singer et al., 2009). El estudio de los cambios estructurales en esta área cerebral ante el efecto de sustancias de abuso, toma importancia al ser la CPFm una estructura que participa en la construcción de una representación mental de las metas y objetivos, así como en la asignación de valor y la capacidad de coordinar acciones basadas en la evaluación de estas (Miller & Cohen, 2001).

El NAc por su parte, es una de las áreas cerebrales de mayor interés, puesto que tiene una importante papel como conector funcional entre áreas límbicas tales como la amígdala y el Hip con el sistema motor (Klawonn & Malenka, 2018), de manera que permite procesar las propiedades hedónicas de un objetivo, como una sustancia de abuso y darle un valor motivacional llevando a la ejecución de acciones para conseguirlo (Hyman et al., 2006). La administración de anfetamina produce, en esta área cerebral un aumento en la densidad de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas (Crombag et al., 2005; Ferrario et al., 2005; Li, Acerbo, & Robinson, 2004; Robinson & Kolb, 1997; Singer et al., 2009) y un aumento en las ramificaciones dendríticas y su longitud (Singer et al., 2009).

Áreas menos estudiadas son el Hip y el Ed. En el Hip por ejemplo, se reporta un aumento en las cantidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales en la zona CA1 (Crombag, 2004). En el Ed, por su parte, la anfetamina y la metanfetamina –droga con una alta similitud estructural a la anfetamina– aumentan la densidad de espinas dendríticas (Jedynak et al., 2007; Singer et al., 2009). Sin embargo, es importante una mayor evaluación y comprensión sobre los cambios plásticos en estas dos áreas cerebrales pues sus funciones los hace blanco de estudio en el tema de la dependencia a drogas de abuso. El Hip participa en proceso de aprendizaje y memoria, principalmente en la formación de la memoria declarativa (Kutlu & Gould, 2016), así como en procesos de navegación espacial (Eichenbaum, 2017). El Ed por su lado, permite la consolidación de acciones eficientes que llevan a la obtención de recompensas en una acción conjunta con la substantia nigra, es decir, gobierna las acciones motoras en función de una meta determinada, como la obtención de un estímulo recompensante (Packard & Knowlton, 2002; Vanderschuren et al., 2005).

Las drogas psicoestimulantes no solamente influyen en la longitud de las dendritas y la densidad de espinas dendríticas, sino que también favorecen cambios en el tamaño y/o la morfología de la espina dendrítica (Golden & Russo, 2012), lo cual tiene una relación estrecha con su función y con la fuerza de la sinapsis que compone (Lee et al. 2012). Robinson et al. (2001) describieron que ratas expuestas a un protocolo de auto-administración de cocaína mostraron cambios en la morfología de las espinas en células piramidales de la corteza prefrontal promoviendo formas más protuberantes y ramificadas (Robinson & Berridge, 2001). Por su parte, Shen et al. (2009) observaron que, tras un periodo de retirada después de la administración de cocaína, las espinas presentan un mayor diámetro y longitud.

1.4.2 Cascadas de señalización y plasticidad asociadas con anfetamina

A continuación, se detallarán algunas vías de señalización y los genes asociados cuya expresión se ve afectada tras el consumo de anfetamina u otros psicoestimulantes como la cocaína, y que podrían mediar en las modificaciones plásticas que se observan en áreas cerebrales que participan en la respuesta inicial al consumo de drogas, así como también en el desarrollo de la dependencia.

Algunos de los factores genéticos relacionados con los cambios estructurales inducidos por el consumo de drogas psicoestimulantes ya han sido identificados, pero poco se sabe sobre los potenciales marcadores moleculares de la plasticidad estructural asociados con las cascadas de señalización iniciadas por la anfetamina. Por ejemplo, existe particular interés en la comunidad científica en determinar cuáles son los mecanismos y los factores relacionados con la incubación de la sensibilidad a la anfetamina. Se ha sugerido que los cambios plásticos que ocurren durante esta etapa del desarrollo de la dependencia pueden ser modulados por vías de señalización donde participa el Glu a través de sus receptores de N-metil D-aspartato (NMDA) (Schumann & Yaka, 2009), y de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Bowers et al., 2010), o por factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (Corominas et al., 2007). Ambos factores activan vías de señalización con distintos blancos moleculares que están involucrados en los procesos de plasticidad. A continuación, se

describen las moléculas que participan en estas cascadas de señalización, de especial interés para este estudio.

TrkB y BDNF:

BDNF pertenece a la familia de factores de crecimiento nervioso, grupo de proteínas que han sido asociadas con la proliferación, diferenciación y supervivencia neuronal (Guillin et al., 2001). La vía de señalización de BDNF iniciará cuando este se une a su receptor tirosín-quinasa relacionado con tropomiosina (TrkB). Una vez activado, el receptor va a transautofosforilarse en residuos de tirosina específicos en sus dominios intracelulares (Cunha, 2010; Williams & Undieh, 2009). Dentro de las vías intracelulares activadas por BDNF se describen tres principales cascadas de señalización corriente abajo: 1) activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), 2) la vía de la fosfatidil inositol tres quinasa (PI3K) y 3) la fosfolipasa C (PLC γ) (Fig. 5) (Williams & Undieh, 2009).

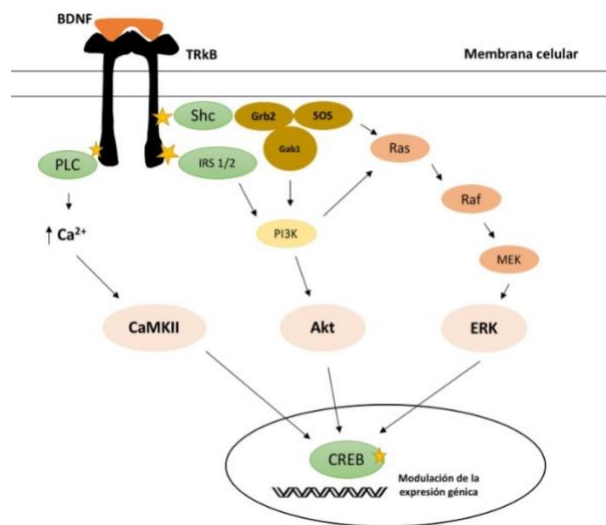


Figura 5. Vías de señalización intracelulares iniciadas por la activación del receptor TrkB. Tras la unión de BDNF el receptor se dimeriza lo que induce la transautofosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplasmático, el cual actúa como sitio de unión y activación para moléculas efectoras de tres vías de señalización principales: fosfolipasa C (PLC γ), fosfatidil inositol tres fosfato quinasa (PI3K) y las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), lo cual lleva a la activación final de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB). Adaptado de Cunha et al., 2014.

Adicionalmente, otra forma de activación de las vías del receptor TrkB involucra la internalización del complejo BDNF-TrkB (mediado por Ca^{2+}) en forma de endosomas, en

conjunto con un transporte retrógrado a lo largo de los axones. El traslado de los endosomas desde las neuritas distales hasta el cuerpo celular es esencial para la acción biológica inducida por BDNF, el cual permite que se induzca la activación de señales corriente abajo (Bramham & Messaoudi, 2005; Vásquez et al., 2014).

La vía BDNF-TrkB ha sido involucrada en la regulación de la morfología de la neurona al modular la formación de nuevas sinapsis (Alsina et al., 2001; Sanchez et al., 2006), la formación de nuevas dendritas y la extensión de axones (Dijkhuizen & Ghosh, 2005; Hu et al., 2005; Jin et al., 2003; Sanchez et al., 2006) y regular la aparición y reestructuración de espinas dendríticas (Ji et al., 2005; Tyler & Pozzo-Miller, 2003). Se ha descrito que BDNF juega un papel importante en la plasticidad sináptica, la supervivencia y la función de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, que forman parte del circuito de recompensa dopaminérgico, las cuales tienen gran relevancia en los procesos de dependencia. Con base en lo anterior se sugiere que esta neurotrofina y sus señales intracelulares están involucradas en los cambios neuroadaptativos en los sistemas dopaminérgicos y glutamatérgicos, que podrían participar en el desarrollo de dependencia y abuso de los psicoestimulantes (Corominas et al., 2007). Esta participación de BDNF se basa en estudios donde la administración de cocaína en roedores aumenta los niveles de la proteína BDNF y de su ARNm en regiones cerebrales que participan en los procesos relacionados con el desarrollo de la dependencia (Schoenbaum et al., 2007). Por ejemplo, el NAc (Filip et al., 2006a; Graham et al., 2007; Grimm et al., 2003), el Hip (Filip et al., 2006a) y el ATV (Grimm et al., 2003; Li & Wolf, 2015).

Además, algunos cambios en los patrones de comportamiento de los animales se han asociado con el aumento en los niveles de BDNF en estas áreas. Por ejemplo, el desarrollo de la sensibilización conductual (Li & Wolf, 2015). Ratones knockout para BDNF mostraron un desarrollo menor y más tardío de la sensibilización locomotora a la cocaína (Horger et al., 1999; Huang et al., 2011). Del mismo modo, en estudios en ratones modificados genéticamente para no expresar el receptor TrkB se observó que los animales no desarrollaron la sensibilización locomotora posterior a la exposición a la droga, lo cual

demuestra que la activación del receptor es necesaria para el desarrollo de la sensibilización (Crooks et al., 2010).

Aún no está del todo claro cuáles son las regiones cerebrales en las que BDNF participa en la generación de una sensibilización conductual. Sin embargo, los estudios sugieren que la acción de la neurotrofina es importante en áreas como NAc, corteza prefrontal y posiblemente el ATV (Li & Wolf, 2015).

CREB:

CREB es una familia de factores de transcripción expresados en la totalidad de las células cerebrales (Mayr & Montminy, 2001). Estas son proteínas de alrededor de 46 kDa ubicadas en el núcleo celular. Existen dos genes diferentes en esta familia: CREB1 y CREB2. CREB1 presenta tres isoformas α , β y γ producidas mediante splicing alternativo (Hansen & Zhang, 2013) y se ha asociado con la activación de la transcripción de genes. Por otro lado, CREB2 se ha relacionado tanto con la activación, como también con la inhibición de la transcripción (Brightwell et al., 2004; Loubon & Franco, 2010). Ambos se han descrito como moléculas reguladoras en la formación de la memoria (Carlezon et al., 2005; Dash et al., 1990; Johannessen et al., 2004).

La activación de CREB inicia al fosforilarse en el residuo de serina 133, lo que le permite su dimerización con otra molécula CREB fosforilada (CREBp) en el mismo residuo. El dímero de CREBp se une a una secuencia de ADN llamada CRE (elemento de respuesta al AMPc), permitiendo el reclutamiento de coactivadores proteicos, tales como la proteína de unión a CREB (CBP) y el p300. Estas proteínas son importantes para la transcripción ya que tienen capacidad de promover la acetilación de histonas, favoreciendo la descompactación de la cromatina, y facilitando la transcripción por medio de la ARN polimerasa II (Carlezon et al., 2005; Hyman & Malenka, 2001; Johannessen et al., 2004) (Fig. 6). La formación de este complejo transcripcional permite la síntesis de ARN de factores que promueven la sinapsis (Barco et al., 2005; Benito & Barco, 2010).

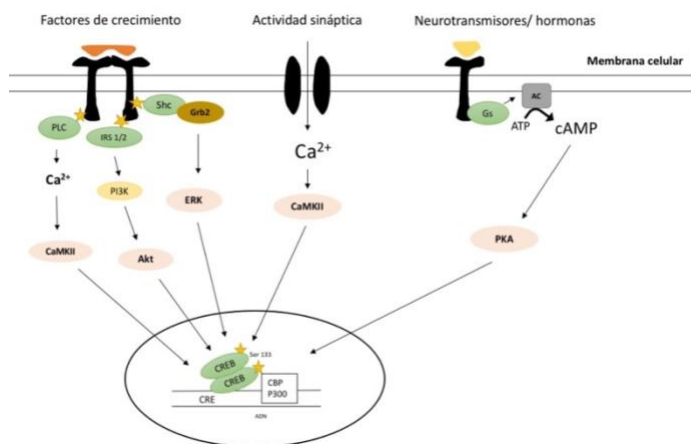


Figura.6. Vía de señalización que activan la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB). Se muestran las vías de señalización activadas por factores de crecimiento, por el aumento intracelular de calcio y por neurotransmisores u hormonas. Adaptado de Hansen III & Zhang, 2013.

Existen diferentes mecanismos involucrados en la activación de CREB: 1) a través de un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} mediante la activación y apertura de canales iónicos, 2) por receptores acoplados a proteínas G, o 3) por medio del receptores con actividad tirosín-quinasa (Carlezon et al., 2005; Johannessen et al., 2004; Watson et al., 2001) (Figs. 5 y 6). Lo que define cuáles mecanismos de activación van a estar en funcionamiento son las experiencias y los estímulos externos que inducen la activación y/o expresión de aquellas moléculas necesarias para estabilizar cambios estructurales y funcionales en la neurona (Benito & Barco, 2010).

El factor de transcripción CREB es un regulador importante del crecimiento dendrítico y de la actividad dendrítica en neuronas maduras (Wayman et al., 2008). En algunas áreas cerebrales, CREB se asocia con la espinogénesis (Russo et al., 2010), efecto que está posiblemente regulado por sus blancos transcripcionales como por ejemplo el factor estimulador de miocitos 2C (MEF2C, por sus siglas en inglés) (Pulipparacharuvil et al., 2008; Robison & Nestler, 2011) y el BDNF (McGinty et al., 2010). CREB también media la plasticidad a través de la transcripción de microARNs como mir-132, el cual induce el crecimiento en células hipocámpales en cultivo (Russo et al., 2010). Algunos de sus blancos moleculares han sido directamente ligados a procesos de plasticidad ante la exposición a psicoestimulantes, lo que podría mediar cambios estructurales después de la exposición a las

sustancias de abuso, sin embargo los mecanismos no están aún claramente dilucidados (Russo et al., 2010). Existe también evidencia de que en el NAc CREB media la tolerancia y dependencia a la cocaína (Larson et al., 2011).

La participación de CREB como una molécula involucrada en los procesos de desarrollo de sensibilización conductual también ha sido estudiada. Fue desde 1994 aproximadamente, que se empezó a hablar en la literatura de posibles modificaciones en las vías de señalización y en la expresión de genes inducidos por la exposición a drogas psicoestimulantes como la cocaína (Miserendino & Nestler, 1995) y la anfetamina (Konradi & Cole, 1994; Turgeon et al., 1997). Se han reportado datos que indican que al inhibirse CREB en el estriado, aumenta la sensibilización locomotora a la cocaína en ratones adultos (Fasano et al., 2009), además ratones transgénicos en los cuales el gen CREB presenta una actividad transcripcional reducida también mostraron un aumento en la actividad locomotora inducida por este mismo psicoestimulante (Walters & Blendy, 2001). Por el contrario, algunos estudios relacionados con otras áreas cerebrales como el núcleo accumbens, han reportado a partir de análisis inmunohistoquímicos que la fosforilación de CREB y una de sus quinasas reguladoras (ERK) aumenta en ratas expuestas a protocolos de sensibilización a cocaína, aumentando también la respuesta locomotora (Marin et al., 2009).

p250GAP:

p250GAP es una proteína activadora de GTPasas (GAPs, por sus siglas en inglés). Tiene un dominio GAP en su región N-terminal y varias secuencias ricas en prolina en su región C-terminal, se encuentra en la densidad postsináptica co-localizada con los receptores NMDA (Taniguchi et al., 2003). Modula GTPasas de la familia Rho (como RhoA, Cdc42 y Rac1) que son reguladores fundamentales de la organización del citoesqueleto (Taniguchi et al., 2003).

Se han realizado estudios sobre la participación de p250GAP en la regulación de la plasticidad estructural, donde su interacción con la subunidad GluR2 del receptor NMDA se posiciona como un escalón importante entre la activación del receptor y la reorganización de las filamentos de actina, y así, de la morfología axonal y dendrítica (Lai & Ip, 2013;

Taniguchi et al., 2003). Por ejemplo, la activación de p250GAP disminuye la actividad de moduladores importantes en procesos de remodelación dendrítica como la RhoA (Nakazawa et al., 2008; Taniguchi et al., 2003). Esto ha sido confirmado en experimentos donde se estudian ratones Knock-down para p250GAP, en los cuales el incremento en la actividad de RhoA incrementa el grosor de las dendritas hipocampales primarias (Nakazawa et al., 2008).

Los niveles de p250GAP son regulados por moléculas como el microARN mir-132 (Wayman et al., 2008). Los microARNs son pequeños ARNs no codificantes (de aproximadamente 22 nucleótidos) que regulan varias vías moleculares a partir de un silenciamiento de genes de forma transcripcional y post transcripcional (Shaltiel et al., 2013). Algunos estudios han revelado que mir-132 puede modificar funcional y estructuralmente las sinapsis, mediante la represión de p250GAP, lo que activa vías de remodelación de la actina (Hansen, Sakamoto, Wayman, Impey, & Obrietan, 2010; Impey et al., 2011; Shaltiel et al., 2013; Wayman et al., 2008). Es importante mencionar que la expresión de miR-132 es inducida por BDNF y CREB (Im & Kenny, 2012; Shaltiel et al., 2013). De hecho, CREB y miR-132 forman un retrocontrol positivo que promueve la formación de espinas dendríticas (Im & Kenny, 2012).

La participación de p250GAP en el desarrollo del proceso de sensibilización conductual en respuesta al consumo de drogas de abuso no ha sido descrita en la literatura. Su participación en procesos de plasticidad ante estímulos ambientales se limita a su silenciamiento en vías que involucran la expresión de mir-132 que, como se mencionó arriba, ha sido señalada como moduladora de cambios estructurales a nivel neuronal, por lo que p250GAP puede ser postulada como una molécula intermediaria en vías de señalización pertenecientes a procesos de cambio en la estructura neuronal ante estímulos ambientales como el consumo de psicoestimulantes.

ADF/cofilina y complejo Arp 2/3:

Los cambios en la estructura neuronal involucran el reordenamiento del citoesqueleto compuesto por microfilamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermediarios o neurofilamentos (Dosremedios et al., 2003; Toda, 2006). Más específicamente, el reordenamiento de los microfilamentos se asocia con los cambios en la morfología y el

número de espinas dendríticas. El ensamblaje y desensamblaje, como un ciclo de la actina, principal componente de los microfilamentos, está controlado por varias proteínas de unión a la actina (ABPs, por sus siglas en inglés) (Dosremedios et al., 2003), que mantienen el equilibrio entre las dos formas conocidas de la actina: los microfilamentos (F-actina) y las subunidades globulares de actina (G-actina) (Esparza et al., 2012).

Según Bambur y Neil (2002), durante el ciclo de la actina las G-actina necesariamente deben estar unidas a moléculas de ATP para ensamblarse al extremo llamado de “rápido crecimiento” o “extremo romo” de la F-actina donde, tras la hidrólisis del ATP, el complejo actina-ADP quedará unido al filamento (Bamburg & Wiggan, 2002). Por el contrario, las actina-ADPs del extremo de “acortamiento” tenderán a disociarse para ser reutilizadas como G-actina, lo que mantendrá la longitud de los microfilamentos relativamente constante (Fig. 7A). Cambios rápidos en los niveles de F-actina y G-actina están involucrados en variaciones morfológicas de las células, que son controladas espacial y temporalmente en respuesta a señales ambientales (Carlier et al., 1997). Las proteínas miembros de la familia del factor de despolimerización de la actina (ADF por sus siglas en inglés) / cofilina, forman parte de las ABPs y se conocen por tener un rol muy importante en la dinámica de F-actina (Bernstein & Bamburg, 2010). Estas se expresan de forma ubicua en células eucariotas y en los mamíferos están representadas por tres proteínas específicas: la ADF, la cofilina muscular y la cofilina no muscular (Cfl1) (Bamburg & Wiggan, 2002).

La Figura 7B muestra el mecanismo mediante el cual las ADF/cofilinas regulan la dinámica de la F-actina. El complejo actúa tanto como estabilizador de la F-actina como regulador de la fragmentación o el crecimiento de los filamentos (Bamburg & Wiggan, 2002). La promoción del crecimiento o la disminución de la longitud de los filamentos por parte de la ADF/cofilina, depende de la disponibilidad de subunidades de actina en la región celular donde está ocurriendo el proceso (Bamburg & Wiggan, 2002) y de la concentración de otras ABPs (Bernstein & Bamburg, 2010). Troys et al. (2008) describen tres posibles escenarios: 1) en bajas concentraciones la ADF/cofilina está unida a la F-actina y puede participar en el corte de porciones de los filamentos; 2) cuando los niveles del complejo unido al filamento son un poco más altos, la ADP/cofilina propicia la liberación del fosfato inorgánico (Pi)

durante el paso del ATP a ADP unido a la G-actina, lo que favorece la liberación del complejo del extremo de acortamiento y estabiliza el filamento; y 3) en concentraciones altas de ADF/cofilina se promueve la unión de nuevos monómeros al extremo de crecimiento, con lo que la nucleación *de novo* se ve favorecida (Van Troys et al., 2008) (Fig. 7B).

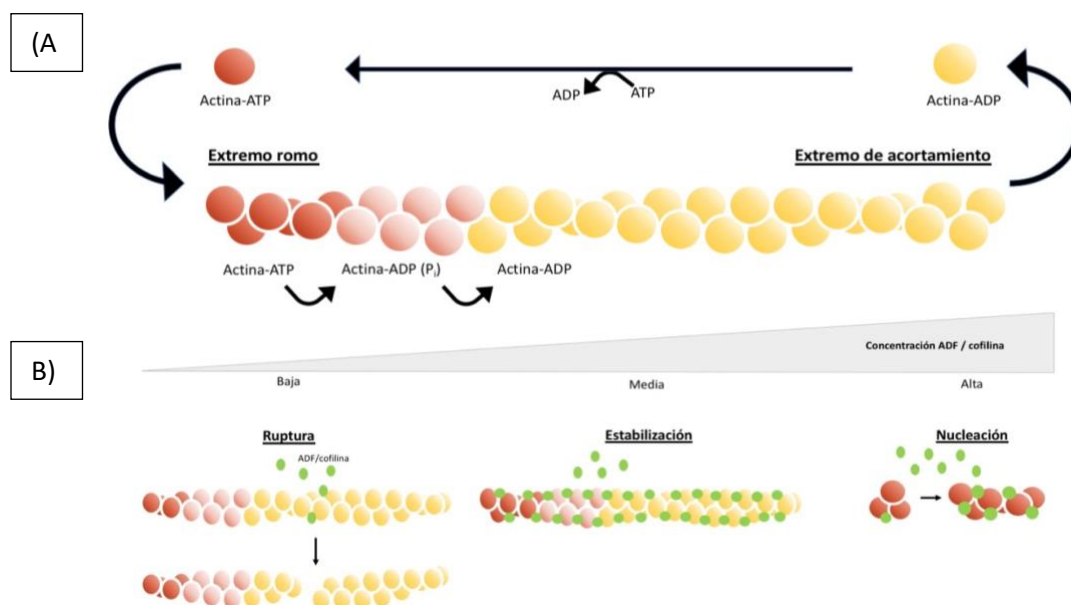


Figura 7. Ensamblado y ciclo de la actina y efectos del factor de despolarización de la actina (ADF) y cofilina. A) Estado estable de los filamentos de actina en donde la longitud de los filamentos se mantiene constante a partir de la agregación de actina unida a ATP en el extremo romo y la disociación de actina unida a ADP en el extremo de acortamiento, B) participación de las ADF/cofilina como estabilizadora o promotora del crecimiento o acortamiento de los filamentos según la concentración de esta en el medio. Adaptado de Van Troys, 2008.

La función de estas proteínas está regulada por procesos de fosforilación y desfosforilación. Específicamente, la fosforilación de las ADF/cofilinas en el residuo de serina 3 (Ser3) de la cofilina (Moriyama et al., 1996), inhibe su unión con subunidades de G-actina y con los F-actina al generar repulsión de cargas entre el complejo y la actina (Bamburg & Wiggan, 2002; Bernstein & Bamburg, 2010). Existen cuatro quinasas que tienen alta afinidad por los residuos de serina de las ADF/cofilinas: las LIM quinasas 1 y 2 y las TES quinasas 1 y 2 (Bamburg & Wiggan, 2002). Las LIM y TES quinasas, son proteínas a su vez activadas por la familia Rho-GTPasas, como por ejemplo Rac, Cdc42 o ROCK (a excepción de la TES) (Bamburg & Wiggan, 2002). Por el contrario, la desfosforilación aumenta la afinidad del

complejo por la actina (Esparza et al, 2012), en este caso este proceso se lleva a cabo por la familia de fosfatasa llamadas Slingshot (Niwa et al., 2002).

El complejo proteico Arp 2/3 por su parte, conocido también como el “complejo de proteínas 2 y 3 relacionados con la actina”, también forma parte de las descritas ABPs. Estas proteínas, tienen una participación en la remodelación dendrítica en respuesta a la actividad sináptica y estímulos ambientales, uniéndose como un complejo de siete subunidades a los filamentos de actina ya existentes y dirigiendo el crecimiento de un nuevo filamento en ángulos de 70° (Dosremedios et al., 2003; Kim et al., 2013). Este proceso está regulado por distintas proteínas que son llamadas factores promotores de la nucleación como WAVE1, WASH y N-WASP (Rotty et al., 2013), las cuales a su vez son reguladas por Rho-GTPasas (Dosremedios et al., 2003). La inhibición de la actividad de Arp 2/3 reduce la polimerización de actina afectando la estructura neuronal al disminuir el tamaño de las espinas dendríticas (Singer et al., 2016).

Existe una relación funcional entre la ADF/cofilina y la Arp 2/3. Así por ejemplo, estudios *in vitro* han mostrado que la ADF/cofilina aumenta la remoción de las ramificaciones iniciadas por la Arp 2/3 (Chan et al., 2009). Por otro lado, aunque en estudios *in vivo* se han realizado observaciones similares, también hay evidencia de que la ADF/ cofilina es capaz de regular negativamente a Arp 2/3, reduciendo la afinidad del complejo por los filamentos (Bernstein & Bamberg, 2010).

Estas ABPs han sido estudiadas por su rol en procesos de plasticidad neuronal en respuesta a consumo de sustancias de abuso. En modelos animales de dependencia, como el modelo de recaída, se ha reportado un aumento en los niveles de ABPs en el NAc posterior al consumo agudo y crónico de cocaína (Toda et al., 2006). Específicamente al utilizar protocolos de incubación de la sensibilización conductual, se reporta un aumento en la densidad de espinas dendríticas y el tamaño de la dendrita en NAc, acompañado de un aumento de ABPs como Arp2/3, ADF/cofilina y de F-actina (Shen et al., 2009).

1.4.3 Integración de las cascadas de señalización y plasticidad asociadas con anfetamina

Basado en la información sobre la función de las proteínas descritas en el apartado anterior, la Figura 9 integra las cascadas de señalización que se propone podrían tener participación en procesos de plasticidad inducidos por el consumo de anfetamina. BDNF participa como una molécula mensajera que orquesta cascadas de señalización relacionadas con procesos de plasticidad estructural en respuesta al consumo de psicoestimulantes. El consumo de anfetamina genera un aumento en las concentraciones de DA en distintas áreas cerebrales que forman parte del sistema de recompensa. El aumento de DA (1) participa en la modulación de la señalización glutamatérgica (2) y a su vez aumenta los niveles del BDNF (3) al actuar en conjunto con la actividad de Glu (3). Las vías de señalización intracelulares activadas por: a) el receptor TrKB tras la unión de BDNF, b) por el receptor de dopamina de tipo 1 (D1) y c) por los receptores AMPA y NMDA activados por Glu, convergen en la regulación del factor de transcripción CREB (4), aumentando su estado fosforilado y así su activación (5). CREB modula la transcripción de una gran cantidad de genes, muchos de los cuales darán lugar a productos proteicos funcionales que participan en la modulación de la plasticidad neuronal (ej., BDNF, TrKB y CREB), así como de moléculas como microARNs importantes también en estas señalizaciones (e.g., mir-132)(6). El mir-132 modula los niveles de proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) como p250GAP (7) al inducir la degradación de los transcritos o regular procesos traduccionales, lo cual tiene una implicación en la actividad regulatoria de las ABPs (8). Las ABPs participan activamente en la reorganización del citoesqueleto y por ende en los cambios morfológicos que podrían ser inducidos por el consumo de anfetamina y llevar al desarrollo de dependencia.

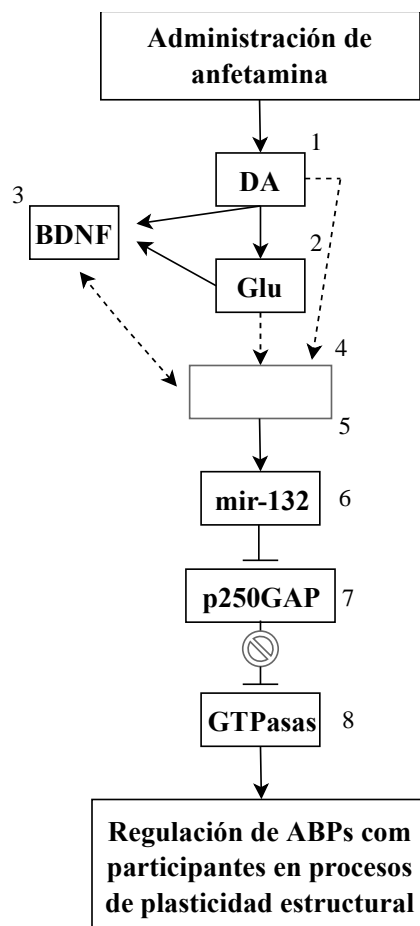


Figura 8. Integración de la actividad de moléculas participantes en cascadas de señalización, en respuesta al consumo de amfetamina. Las líneas continuas representan las moléculas cuyas vías de señalización culminan en la potenciación de la actividad de la molécula señalada, las líneas discontinuas representan las moléculas cuyas vías de señalización culminan en la potenciación de la actividad de CREB, la línea con terminación recta representa la inhibición de la actividad de la molécula, la numeración corresponde al orden en que los eventos fueron descritos en el texto.

2 Justificación

La dependencia a drogas de abuso, específicamente a psicoestimulantes como la anfetamina, representa un problema en diversos ámbitos: social, económico y de salud, entre otros, por lo que afecta tanto al consumidor, como a la sociedad en general, convirtiéndose en una problemática mundial (Corominas et al., 2007). Dentro de las principales consecuencias se pueden mencionar: la desintegración familiar, la pérdida de empleo, daños en la salud física y psicosocial, el aumento en el crimen organizado y el narcotráfico, entre otras (Robinson y Nestler, 2011). En este sentido, se debe resaltar la importancia de estudiar la dependencia a drogas de abuso, no solamente desde los aspectos sociales fundamentales para atender la problemática, sino propiamente desde el individuo y los procesos neurobiológicos que propician el desarrollo de la dependencia. Este abordaje permitirá comprender mejor los procesos cerebrales y arrojar información que sea de utilidad en la prevención y el tratamiento de la enfermedad.

El desarrollo de una dependencia consta de distintas etapas que van desde el consumo casual hasta la consolidación de conductas de abuso y consumo compulsivo (Singer et al, 2009). La sensibilización conductual se asocia con la transición del consumo casual al consumo compulsivo y el desarrollo de la dependencia (Vezina, 2004). El estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo y mantenimiento de esta etapa puede aportar información relevante para identificar blancos moleculares que permitan tratar o prevenir este tipo de trastornos (Singer et al, 2009) y así buscar soluciones a tan importante problema.

El proceso de sensibilización se está estudiando experimentalmente de modo intensivo en el ámbito bioquímico y conductual, pues representa la expresión de cambios plásticos estructurales en el cerebro debidos al consumo de, por ejemplo, anfetamina (Kolb et al., 2003). Sin embargo, a pesar de que es un tema estudiado desde hace dos décadas (Robinson y Kolb 1997), se conoce poco sobre los mecanismos moleculares y las vías de señalización cerebrales que subyacen a estos cambios estructurales, especialmente durante el desarrollo de la sensibilidad conductual y la incubación de esta. Por lo tanto, este trabajo pretende aportar información sobre los posibles cambios en la expresión de genes involucrados en la regulación de la plasticidad estructural inducida por la anfetamina en áreas cerebrales del

sistema de recompensa, utilizando un modelo de desarrollo e incubación de la sensibilidad conductual en ratas, en la búsqueda de aportar información faltante en este tema.

Aunado a esto, es importante mencionar que en el país se han venido realizando esfuerzos por ampliar el conocimiento en las áreas mencionadas, a través de la colaboración del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), el Instituto de Investigaciones Psicológicas (IIP) y el Centro de Investigación en Neurociencias (CIN), todas entidades de la UCR. Este proyecto se enmarca en las líneas de investigación de estos centros, por lo que los resultados que se obtuvieron serán de provecho para las investigaciones en curso y futuras, además de fortalecerán el trabajo interdisciplinario y conjunto de estas entidades aprovechando los recursos de infraestructura y experiencia de los profesionales colaboradores.

La realización de este trabajo de graduación fue posible gracias al financiamiento del proyecto de investigación titulado “Cambios en la plasticidad neuronal relacionados con la incubación de la sensibilidad por la anfetamina: evaluación molecular y estructural” 742-B6-291, inscrito en el INISA y realizado en colaboración con el IIP y el CIN. Es por esto que todos los procedimientos se llevaron a cabo en estos centros de investigación, tomando en consideración que los protocolos utilizados ya habían sido estandarizados, facilitando el desarrollo de la metodología propuesta.

3 Hipótesis

El desarrollo e incubación de la sensibilidad conductual por exposición subcrónica a la anfetamina se asocia con cambios en la expresión de los genes TrkB, BDNF, CREB, p250GAP, Cfl1 y Arp 2 en el NAc, el Hip y el Ed.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Estudiar la respuesta conductual y la expresión de genes relacionados con el control de la plasticidad neuronal (i.e., TrkB, BDNF, CREB, p250GAP, Cfl1 y Arp 2) en tres áreas cerebrales (i.e., NAc, Hip y Ed) de ratas macho Wistar, para analizar su posible participación en el desarrollo y la incubación de la sensibilidad conductual por exposición subcrónica a anfetamina.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Medir la actividad locomotora previo a la administración de anfetamina para determinar si la misma se sensibiliza e incuba de manera anticipatoria en respuesta al protocolo de exposición subcrónico y posterior a un periodo de retirada de 30 días.

4.2.2 Analizar la actividad locomotora en respuesta a la administración subcrónica de anfetamina para determinar si la misma se sensibiliza y se incuba tras un periodo de 30 días de retirada.

4.2.3 Medir la expresión de los cinco genes de interés en el NAc, el Hip y el Ed para determinar los efectos cerebrales de la exposición al protocolo de desarrollo e incubación de la sensibilidad conductual a anfetamina.

4.2.4 Analizar la relación entre la expresión de los cinco genes de interés en cada una de las regiones cerebrales con la variable conductual evaluada tras la exposición a un protocolo de desarrollo e incubación de la sensibilidad conductual a la anfetamina.

5 Materiales y métodos

5.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar provenientes del Bioterio del Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi) de la Universidad de Costa Rica. La metodología se realizó entre el DPN 22 y el DPN74. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos del Ministerio de Ciencia y Tecnología de Costa Rica para el cuidado y uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Costa Rica (CICUA-10-16).

El alimento, agua y las camas de los animales se cambiaron dos veces por semana y se mantuvieron en un horario de luz-oscuridad de 12:12 horas (la luz se encendía alas 6:00 h y se apagaba a las 18:00 h), con 10 ciclos de aire por hora, una temperatura del cuarto de 25.5 °C±1.20 °C y una humedad relativa del 78-87%. Los animales tuvieron acceso libre al alimento y al agua durante todo el experimento.

5.2 Diseño experimental

Se utilizó un total de 40 animales, los cuales fueron llevados al cuarto de animales del CIN luego del destete en el día posnatal 22 (DPN 22) con un peso de 96,13 g. A su llegada, se pesaron e identificaron marcándolos con aros en la cola. Se mantuvieron una semana en dicho cuarto de forma que se habituaran al nuevo ambiente. En el DPN 28 se iniciaron los experimentos. A partir del DPN28, los animales se sometieron a un procedimiento de manipulación (handling) durante tres días consecutivos, con el fin de familiarizarlos con la manipulación del experimentador. Del DPN31 al DPN33 se sometieron a pruebas de campo abierto (CA) de 15 minutos, con el objetivo de habituarlos a estos aparatos, y a su vez, para obtener medidas de la actividad locomotora que permitiera el balanceo de los animales para la asignación de grupos.

La Figura 10 muestra el diseño experimental utilizado. En el DPN33 los animales fueron asignados al grupo de anfetamina (n=20) que recibió siete dosis de 2.5 mg/Kg i.p de anfetamina en un volumen de 1ml/Kg a lo largo de un periodo de doce días (7 inyecciones en total). Los animales restantes (n=20) conformaron el grupo control que recibió el mismo volumen (1ml/Kg) de solución salina en lugar de la droga. Los grupos fueron balanceados según la madre del sujeto, el peso y las conductas de locomoción. De esta forma, se buscó equilibrar el efecto de estas variables sobre la variabilidad en los grupos experimentales. Las administraciones se llevaron a cabo en los DPNs 33, 35, 37, 38, 40, 42 y 44. Previo a cada administración los animales se expusieron a una prueba de CA de 15 minutos con el fin de evaluar su actividad locomotora anticipatoria condicionada. Transcurridos estos 15 minutos, los animales se inyectaron con salina o anfetamina e inmediatamente fueron reintroducidos en el CA por 45 minutos adicionales para evaluar la actividad locomotora inducida por la anfetamina. Posterior a la última administración, se dio un periodo de incubación de la sensibilidad conductual de 30 días. Al finalizar este periodo (DPN 74), se realizó una nueva asignación a lo interno de cada grupo de forma que, dentro del grupo de salina, 10 animales recibieron una inyección final de salina y 10 una de anfetamina (2.5 mg/kg i.p.). De igual forma, de los animales que recibieron anfetamina, 10 recibieron salina y 10 anfetamina (2.5 mg/kg i.p.). De nuevo, todos los animales fueron expuestos a un CA durante los 15 minutos previos y los 45 minutos posteriores a recibir la nueva administración. Los animales fueron eutanasiados 90 minutos después de la inyección.

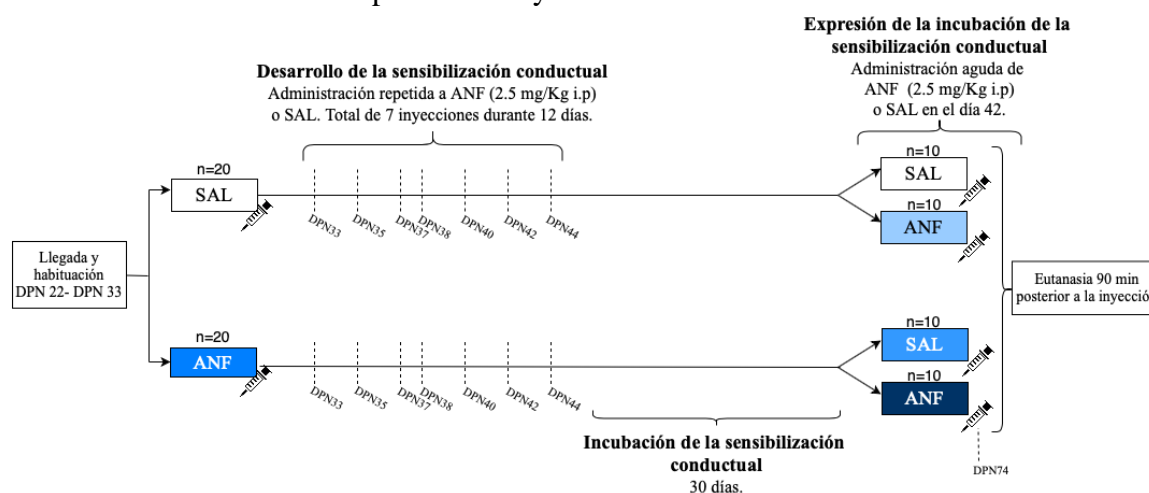


Figura 10. Esquema de la estrategia metodológica para el estudio de la expresión de genes relacionados con la incubación de la sensibilidad conductual.

5.3 Prueba de Campo abierto

Esta prueba conductual se llevó a cabo exponiendo al animal a un espacio abierto cuadrado, cerrado por paredes de color negro con las siguientes dimensiones: 55 cm × 55 cm × 40 cm (Rojas-Carvajal, et al 2018). Los animales se colocaron individualmente en el centro del CA y su conducta se observó por 15 o 45 minutos según correspondiera, al cabo de los cuales el animal fue devuelto a su jaula en el bioterio. Cada sesión se grabó con una cámara (IVD Pixel Plus mini domo IR). Se midió automáticamente la distancia total recorrida mediante el programa computarizado Any-maze 4.3 (Stoelting, USA) iniciando en el momento en que se colocó el animal en el área central de la arena. Los experimentos se realizaron en un cuarto con paredes negras iluminado con luz roja tenue (10 luxes) en una franja horaria entre las 7:00am y las 12:00md. El CA se limpió entre cada sesión con etanol al 70%, para eliminar trazas de olor que pudieran afectar la conducta del siguiente animal.

5.4 Extracción de ARN y transcripción reversa

Las ratas fueron eutanasiadas mediante decapitación en el laboratorio del CIN. Se utilizó este método debido a que se considera de sufrimiento corto, además de que evita alteraciones de la neuroquímica cerebral relacionadas con otros procedimientos. Los cerebros fueron removidos inmediatamente y lavados en solución salina. Se extrajeron mediante disección tres regiones de ambos hemisferios: el NAc, el Hip y el Ed. El tejido se procesó mediante el método de TRIzol, para lo cual cada muestra se colocó en un tubo con 300 µl de TRIzol (Invitrogen, USA), y se homogenizó con un sonificador durante 30 segundos. Las muestras se congelaron de manera inmediata a -70° C hasta su posterior transporte a los laboratorios del INISA, donde se llevaron a cabo los análisis moleculares.

La extracción de ARNm se llevó a cabo según las especificaciones para el método TRIzol. Luego de descongelar el homogenizado, se agregaron 0.2 ml de cloroformo y, tras agitar vigorosamente, se incubó a 25° C por 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12 000/g por 15 minutos a una temperatura de 4° C. Tras la centrifugación se separaron dos fases: la de fenol-cloroformo, de color rojo, que contiene el ADN y proteínas, y por lo tanto se desechó, y la fase acuosa, que fue trasvasada a un nuevo tubo y tratada con una serie de lavados y centrifugaciones con alcohol isopropil y etanol absoluto hasta obtener el

precipitado de ARN el cual se disolvió en agua libre de ARNasas. El ARN se cuantificó en un nanodrop (Thermo Scientific, USA). Para confirmar la integridad del producto 1 μ l del ARN extraído se analizó en un gel de agarosa al 2% (m/v). Posteriormente se utilizaron 500 ng para la transcripción reversa. La transcripción reversa se llevó a cabo mediante el RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA) según las especificaciones de la casa comercial, adaptado para trabajar con un volumen final de 10 μ l. De esta forma, el producto se mezcló con 2 μ l del buffer de reacción, 0.5 μ l del primer oligo (dT)₁₈, 1 mM de dNTPs, 0,5 μ l del inhibidor de ARNasa y 0.5 μ l de la transcriptasa reversa. Las reacciones se incubaron a 42° C por 60 min, seguido de 5 min a 70° C. Los productos (ADNc) fueron diluidos 1:15 y se almacenaron a -20° C hasta su posterior análisis.

5.5 PCR en tiempo real

La cuantificación de ADNc para los genes BDNF, TrkB, CREB, p250GAP, Cfl1 y Arp2, se llevó a cabo mediante PCR en Tiempo Real utilizando SybrGreen (Fermentas, USA) para la amplificación. Los imprimadores para BDNF, TrkB y CREB fueron tomados de artículos publicados (Liu et al., 2010; Rage et al., 2007; Santos & Duarte, 2008), mientras que para p250GAP, Cfl1 y Arp2 se diseñaron mediante el programa Primer 3 y se evaluaron mediante las herramientas en línea PrimerDesign y OligoAnalyzer (Tabla 1). Se utilizó un termociclador Rotor-Gene Q (QIAGEN, Alemania) para correr las reacciones de PCR. La amplificación de PCR en Tiempo real se realizó con 5 μ l de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 75-300 η M de primer (75 η M para HPRT1, CREB y p250GAP; 150 η M de BDNF; 200 η M para Cfl1 y Arp2 y 300 η M para TrkB) y 4 μ l de ADNc, para un volumen final de 10 μ l. El protocolo utilizado para la amplificación dependió del gen a evaluar, se detallan las temperaturas de annealing en la Tabla 1. La fluorescencia fue medida y los valores de Ct calculados mediante el programa Rotor-Gene Q Series. Se utilizó el método de la cuantificación comparativa para los análisis, usando la hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1) como gen de referencia. Las muestras se analizaron por duplicado y cada corrida incluyó un control negativo, para excluir la posibilidad de contaminación con ADN genómico.

Tabla 1. Secuencias de los *primers* y temperaturas de *annealing* para las reacciones de amplificación por PCR en tiempo real.

<i>Gen</i>	<i>Secuencia primer</i>	<i>Temperatura annealing (°C)</i>
<i>BDNF</i>	5'-CAAGGCAACTTGGCCTACCC-3'	64
	5'-GAGCATCACCCGGGAAGTGT-3'	
<i>TrkB</i>	5'-GATCTTACCTACGGCAAGC-3'	58
	5'-TCGCCAAGTTCTGAAGGAGT-3'	
<i>p250GAP</i>	5'-ATGGATTTCAGGTGGGACTCTTC-3'	63
	5'-GCTTTGTTGGGCGAGACTTCAT-3'	
<i>Cfl-1</i>	5'-CTGGAGGAGGGCAAGGAGATT-3'	64
	5'-TCATAGAGAGCATAGCGGCAGTC-3'	
<i>CREB</i>	5'-ACAGTTCAAGCCCAGCCACAG-3'	64
	5'-GCACTAAGGTTACAGTGGGAGCAGA-3'	
<i>HPRT1</i>	5'-CCTTGACTATAATGAGCACTTC-3'	58
	5'-GCCACATCAACAGGACTC-3'	

5.6 Análisis de los datos

Inicialmente se comprobó los supuestos de normalidad, homocedasticidad y esfericidad de las muestras, en caso de incumplimiento del supuesto de esfericidad se hizo la corrección de Mauchly. Los datos se presentan como promedios \pm el error estándar de la media. Las variables conductuales se compararon entre grupos y a través de los días mediante análisis de varianza (ANOVA) mixtos con Tratamientos como factor entre sujetos (salina vrs. anfetamina) y minutos (15 o 45) y días (1-3-5-6-8-10-12) como factores intra sujetos. La expresión génica fue analizada usando el método bootstrapping con un número de 1000 muestras simuladas y con un intervalo de confianza del 95%. Las diferencias entre grupos se analizaron siguiendo los contrastes planeados acordes a las hipótesis propuestas a partir de una inspección visual previa. Los contrastes planeados se limitaron a un número restringido de comparaciones siendo $k-1$ (donde k es el número de grupos) para un total de tres comparaciones posibles. Se determinó un “efecto post” cuando las diferencias en la expresión génica se observaron en los grupos de animales que recibieron ANF en el día 42 independientemente de la experiencia previa (SAL-ANF y ANF-ANF). Caso contrario, se determinó como un “efecto pre” cuando las diferencias en la expresión génica se observaron

en los grupos de animales que recibieron ANF como tratamiento previo independientemente de la sustancia administrada en el día 42 (grupos ANF-SAL y ANF-ANF). Finalmente, se determinó el efecto principal de ANF que correspondió a la diferencia entre SAL-SAL y todos los demás grupos experimentales. Se realizaron análisis de correlación de Pearson para identificar las posibles asociaciones entre las variables conductuales y neuroquímicas tomando en consideración las correlaciones que aportaban información sobre las diferencias significativas observadas en la expresión génica. Se consideraron valores estadísticamente significativos cuando la $p < 0,05$. Se comparó la magnitud del efecto de los tratamientos sobre la conducta mediante los coeficientes ETA parcial cuadrado (η_p^2).

6 Resultados

6.1 Actividad locomotora

6.1.1 Actividad anticipatoria condicionada

Fase de sensibilización conductual

La actividad locomotora previo a la administración del tratamiento disminuye significativamente a lo largo de los 15 minutos de duración de la prueba indistintamente de los días y del tratamiento (Minutos: $F_{(10.702,2846.716)}= 507.138$, $P= 0.0001$, $\eta_p^2= 0.66$) (Fig.10A). El decaimiento progresivo en la actividad locomotora en los 15 minutos del campo abierto se mantiene a lo largo de los días (Minutos x Días: $F_{(64.212,2846.716)}= 1.656$, $P= 0.001$, $\eta_p^2= 0.04$) (datos no mostrados). Un análisis detallado muestra que en los animales tratados con salina la actividad locomotora es menor por minutos y por días que en los que recibieron amfetamina (Días x Tratamiento: $F_{(6,266)}= 2.254$, $P= 0.039$, $\eta_p^2= 0.05$). En los animales que recibieron amfetamina la locomoción se mantiene relativamente estable entre el día 1 y el día 10, sin embargo, muestra un aumento en el día 12 en el cual los animales recibieron la séptima administración de amfetamina (Fig. 10B). De esta forma, la actividad total en la fase de sensibilidad es significativamente mayor en los animales que recibieron amfetamina (Tratamiento: $F_{(1,266)}= 16.309$, $P= 0.0001$, $\eta_p^2= 0.06$) (Fig.10C).

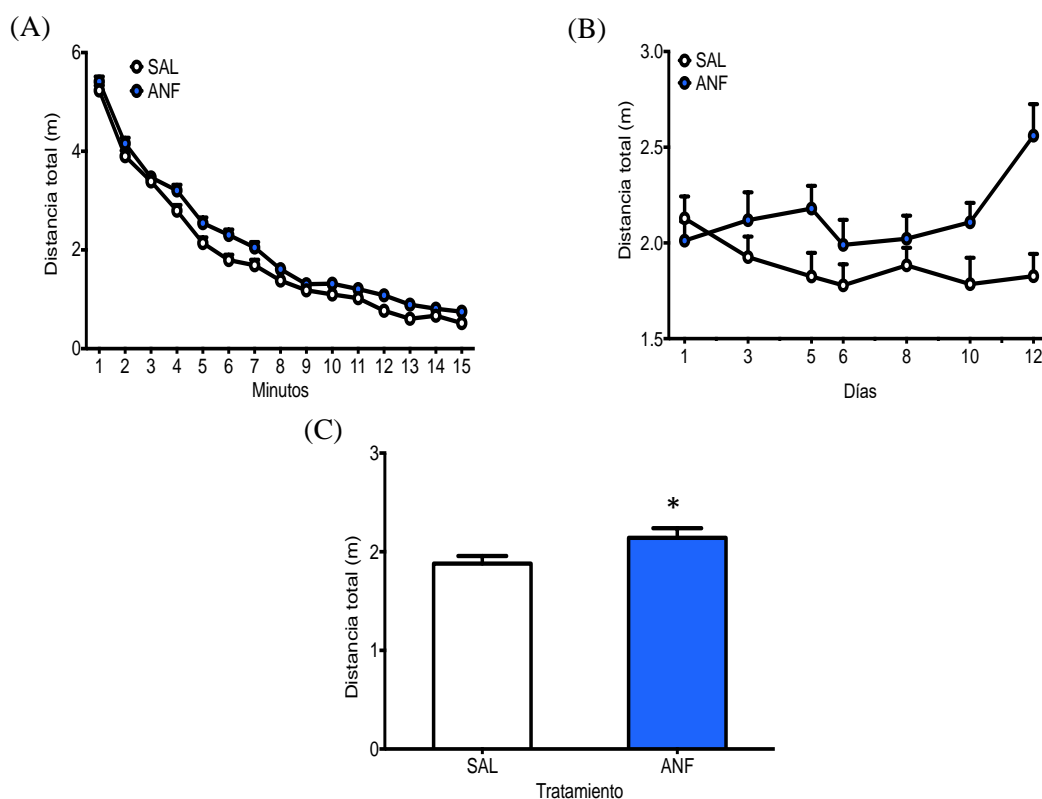


Figura 10. Actividad locomotora anticipatoria condicionada. (A) Promedio de la distancia total por minuto observada durante las 7 mediciones realizadas en la fase de sensibilización conductual en la prueba de campo abierto antes de a recibir el tratamiento (B) Promedio de la distancia total recorrida cada día según el grupo experimental durante los 15 minutos previos a recibir el tratamiento a lo largo de los 12 días de la fase de sensibilidad conductual (C) Promedio de la distancia total recorrida en la fase de sensibilización conductual durante los 15 minutos previos a recibir el tratamiento. * $P < 0.05$

Expresión de la incubación de la sensibilidad conductual

Posterior al periodo de incubación correspondiente a 30 días, los animales fueron expuestos nuevamente a un campo abierto de 15 minutos, previo a la administración de la última inyección (día 42 tras la primera administración de la droga). Como se observa en la figura 11A, la actividad locomotora previo a la administración de la sustancia disminuye significativamente a lo largo de los 15 minutos de la prueba de campo abierto indistintamente de los días y del tratamiento (Minutos: $F_{(9,515,723,165)} = 131.166$, $P = 0.001$, $\eta_p^2 = 0.63$), observándose el mismo comportamiento que en la fase de desarrollo de la sensibilidad. Esta disminución progresiva en la actividad locomotora es aún mayor en el día 42 si se le compara

con la ocurrida en el día 12 en los animales sometidos a ambos tratamientos (Minutos x Días: $F_{(9,515,723.165)}= 5.672$, $P= 0.001$, $\eta_p^2= 0.07$) (datos no mostrados). Respecto al nivel total de la actividad locomotora observada en el día 42, esta continuó siendo significativamente mayor en los animales que recibieron anfetamina (Tratamiento: $F_{(1,38)}= 72.897$, $P= 0.0001$, $\eta_p^2= 0.66$) al igual que en el día 12 (Tratamiento: $F_{(1,266)}= 16.309$, $P= 0.0001$, $\eta_p^2= 0.06$) (Fig. 11B). Cuando se comparó el total de la actividad locomotora entre el día 12 y 42, no se observaron diferencias en ninguno de los dos grupos (Fig. 11B).

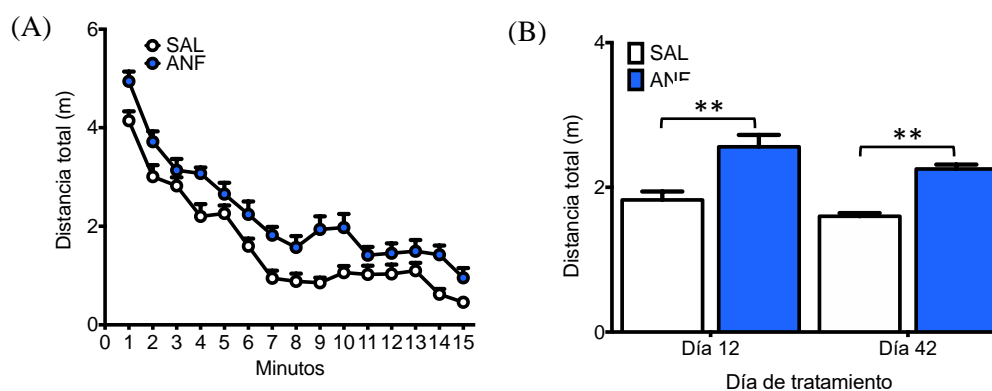


Figura 11. Actividad locomotora anticipatoria condicionada tras un periodo de incubación de 30 días. (A) Promedio de la distancia total por minuto en la prueba de campo abierto realizada antes de recibir el tratamiento. (B) Promedio de la distancia total recorrida durante el día 12 y el día 42. ** $P < 0.001$

6.1.2 Actividad locomotora inducida por la anfetamina

Fase de la sensibilización conductual

En la figura 12A se muestra cómo durante los 45 minutos de la prueba de campo abierto, las ratas expuestas a inyecciones repetidas de anfetamina muestran un aumento lineal de la locomoción hasta el minuto 25, donde se alcanza una fase de meseta hasta el minuto 43 aproximadamente (se utiliza el promedio por minuto de las 7 mediciones realizadas a lo largo de 12 días). Por su lado, en los animales expuestos a salina no se mostraron cambios en la distancia total recorrida por minuto (Minutos x Tratamiento: $F_{(8,847, 2353.260)}= 69.598$, $P= 0.001$, $\eta_p^2= 0.27$) (Fig.12A). La locomoción fue significativamente mayor en las ratas que recibieron anfetamina en comparación con los que recibieron inyecciones de solución salina

a lo largo de los días (Días x Tratamiento: $F_{(6, 266)} = 3.544$, $P = 0.002$, $\eta_p^2 = 0.07$) (Fig. 12B). Además, la actividad locomotora total de los animales expuestos a anfetamina muestra un aumento progresivo alcanzando una fase de meseta en el día ocho. Sin embargo, es a partir del día 6 que hay una diferencia significativa con respecto a la del día 1 (LSD, < 0.05) (Fig. 12B). Por último, la distancia recorrida total promedio (i.e., el promedio de la distancia recorrida durante las siete administraciones) fue mayor en los animales que recibieron anfetamina que en los que recibieron salina (Tratamiento: $F_{(1,266)} = 577.509$, $P = 0.0001$, $\eta_p^2 = 0.69$) (Fig. 12C).

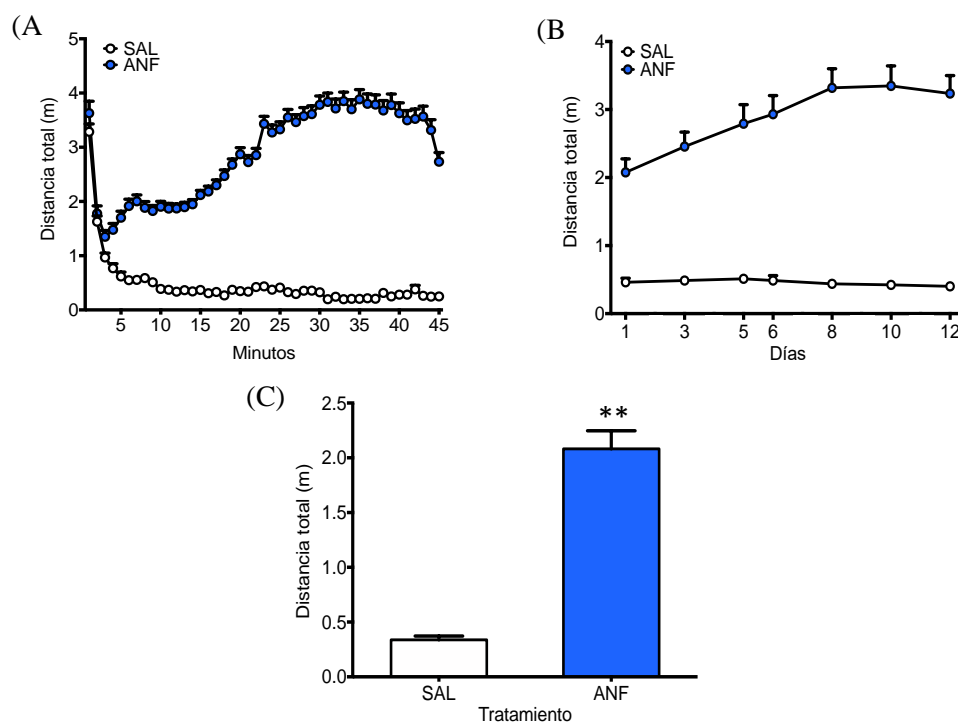


Figura 12. Actividad locomotora inducida por la anfetamina medida en pruebas de campo abierto de 45 minutos durante la fase de desarrollo de la sensibilidad conductual. (A) Distancia total por minuto promediada para las siete sesiones (B) Promedio de la distancia total recorrida observada en cada uno de los días de exposición (C) Promedio de la Distancia total recorrida durante toda la fase de desarrollo de la sensibilización conductual. ** $P < 0.001$.

Expresión de la incubación de la sensibilidad conductual

Posterior a los 30 días correspondientes al periodo de incubación se realizó una nueva clasificación de los animales en cuatro grupos diferentes: SAL-SAL, SAL-ANF, ANF-SAL, ANF-ANF. Igual que en el día 12, los sujetos fueron expuestos al campo abierto por 45

minutos posterior a la inyección. Al realizar un análisis detallado se observó un efecto de la administración aguda de la anfetamina (Tratamiento: $F_{(3, 36)} = 12.383$, $P = 0.0001$, $\eta_p^2 = 0.51$), lo que se refleja como una mayor actividad locomotora en los grupos SAL-ANF y ANF-ANF en comparación a SAL-SAL y ANF-SAL (Fig. 13A).

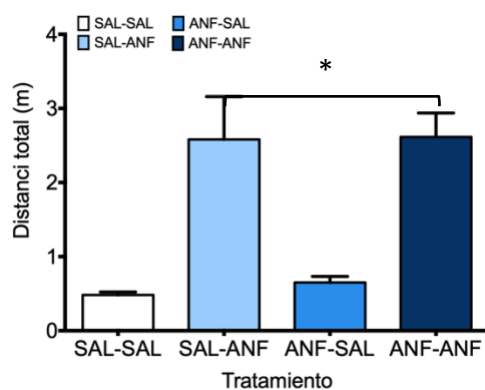


Figura 13. Promedio de la distancia total recorrida inducida por la anfetamina en una prueba de campo abierto de 45 minutos en el día 42 según de tratamiento recibido tras un periodo de incubación de 30 días. * $P < 0.001$.

6.2 Expresión génica

6.2.1 Hipocampo:

Los niveles BDNF y p250GAP no se vieron afectados por el tratamiento con anfetamina (datos no mostrados). Se observó un efecto post en la expresión del receptor TrkB, disminuyendo los niveles del ARNm ($t_{(38)}=-2.181$, $P=0.019$) (Fig.14A). Los niveles de ARNm del factor de transcripción CREB disminuyeron en todos los animales como un efecto principal de la exposición a la anfetamina ($t_{(36)}=-2.423$, $P=0.011$) (Fig. 14A). Los sujetos del grupo ANF-ANF tuvieron una menor expresión de CREB en comparación a los sujetos del grupo control (SAL-SAL) ($t_{(36)}=-2.600$, $P=0.011$). Se evidenció que la exposición aguda de la droga incrementa los niveles de Cfl1 y Arp2 como un efecto post (Cfl1: $t_{(38)}=-1.888$, $P=0.041$; Arp2: $t_{(38)}=-2.035$, $P=0.034$) (Fig. 14B y 14C).

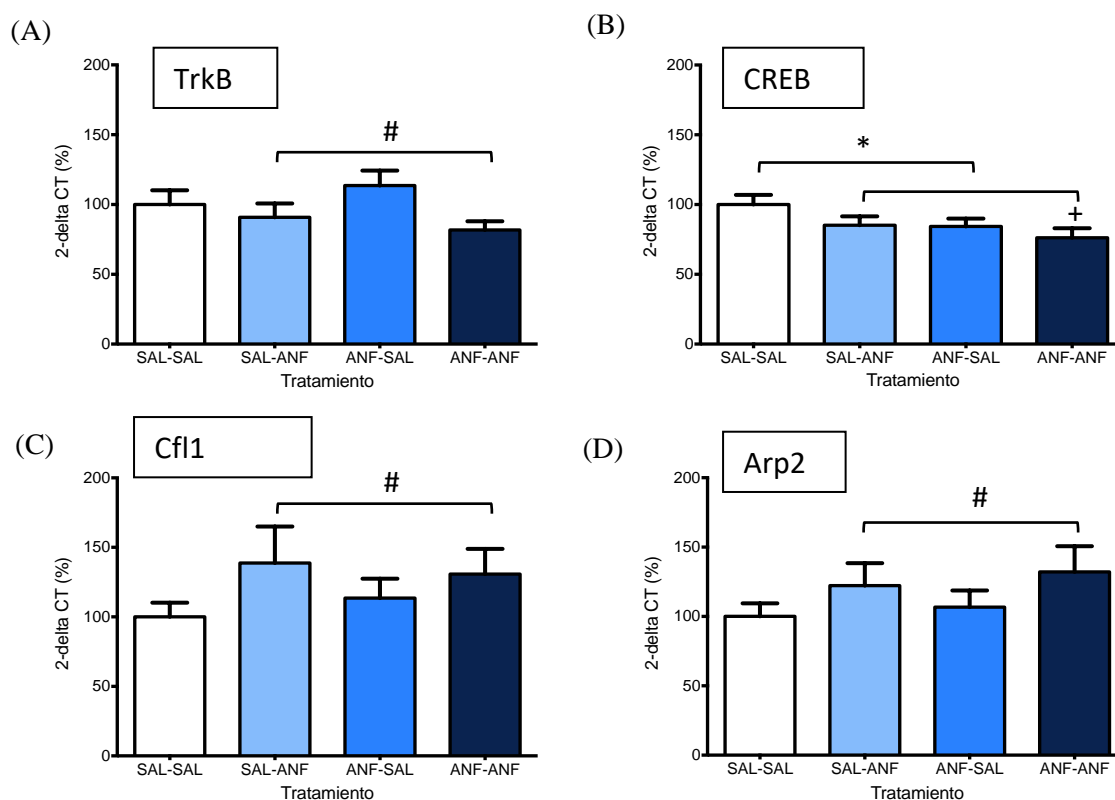


Figura 14. Expresión de (A) CREB, (B) Cfl1 y (C) Arp2 en hipocampo tras una exposición adicional a anfetamina luego de un periodo de incubación de 1 mes. *Efecto principal $P<0.05$, # Efecto post $P<0.05$, + SAL-SAL vs. ANF-ANF $P<0.05$.

6.2.2 Núcleo accumbens:

Se observa un efecto pre en la expresión de TrkB, ya que la exposición subcrónica a anfetamina aumenta la expresión de este receptor ($t_{(38)} = 2.181$, $P=0.018$) (Figura 15A). De igual forma, la exposición a anfetamina previa al periodo de incubación también aumenta los niveles de BDNF en esta área cerebral. Esto se ve reflejado en las comparaciones realizadas entre grupos donde se observa un efecto principal de la exposición a ANF ($t_{(36)} = -2.815$, $P=0.002$), además el grupo SAL-ANF difiere de los grupos ANF-SAL y ANF-ANF ($t_{(36)} = -2.817$, $P=0.005$) (Fig. 15B). Por su parte, no hay un cambio en la expresión de CREB, p250GAP ni tampoco de Cfl1 (datos no mostrados). Con respecto a la expresión de Arp2, se observó una disminución general por el tratamiento con anfetamina independiente de la clasificación final ($t_{(36)} = -1.908$, $P= 0.03$) (Fig. 15C).

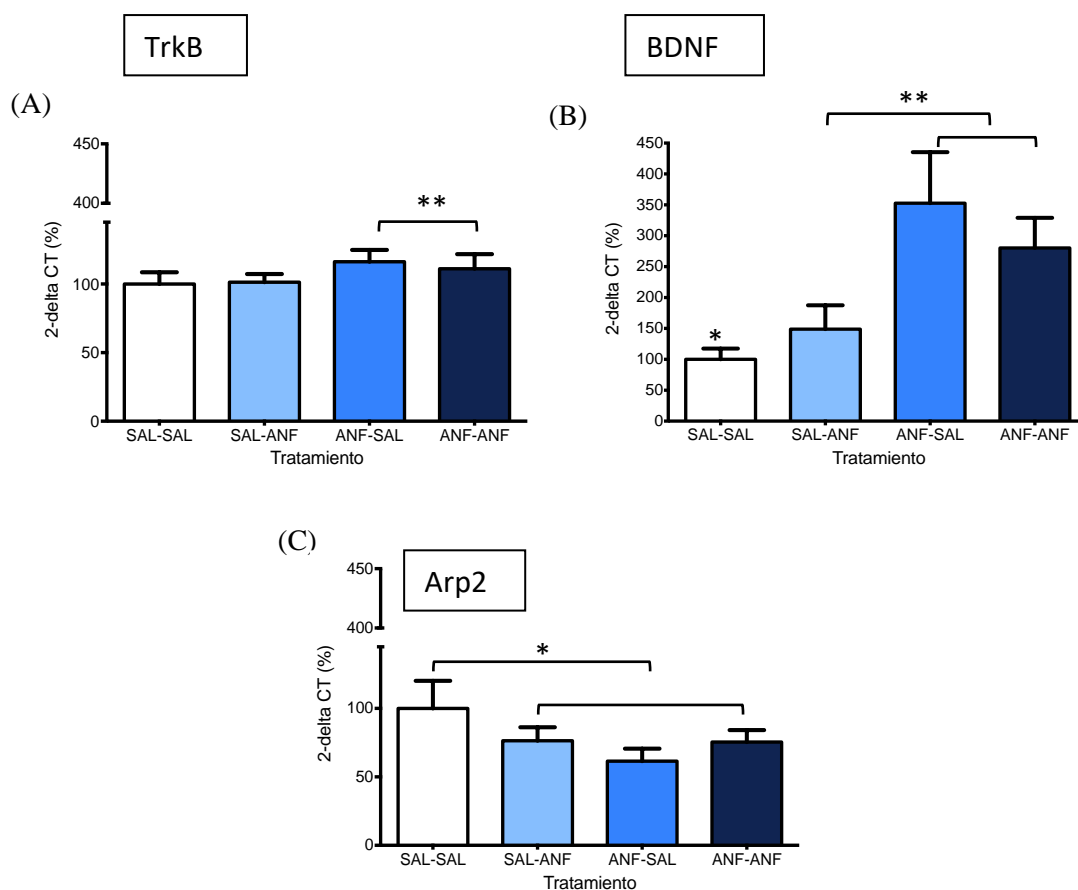


Figura 15. Expresión de (A) TrkB, (B) BDNF y (B) Arp2 en núcleo accumbens tras una exposición adicional a anfetamina luego de un periodo de incubación de 1 mes. *Efecto principal, **Efecto pre.

6.2.3 Estriado dorsal:

La exposición a anfetamina no alteró la expresión de BDNF ni de su receptor en el estriado dorsal (datos no mostrados). La expresión de CREB, p250GAP y Arp2 disminuyó como un efecto principal a la exposición a ANF (CREB: $t_{(36)} = -2.594$, $P=0.013$, p250GAP: $t_{(36)} = -2.943$, $P=0.007$, Arp2: $t_{(36)} = -2.884$, $P=0.011$) (Fig.16). Al realizar comparaciones entre grupos se observó que la expresión de CREB y p250GAP fue menor en los animales del grupo ANF-ANF en comparación a los animales del grupo SAL-SAL (CREB: $t_{(38)} = 2.574$, $P=0.008$, p250GAP: $t_{(36)} = -2.750$, $P=0.013$) (Fig. 16A y B). Los niveles de Cfl1 no cambiaron en esta área cerebral (datos no mostrados).

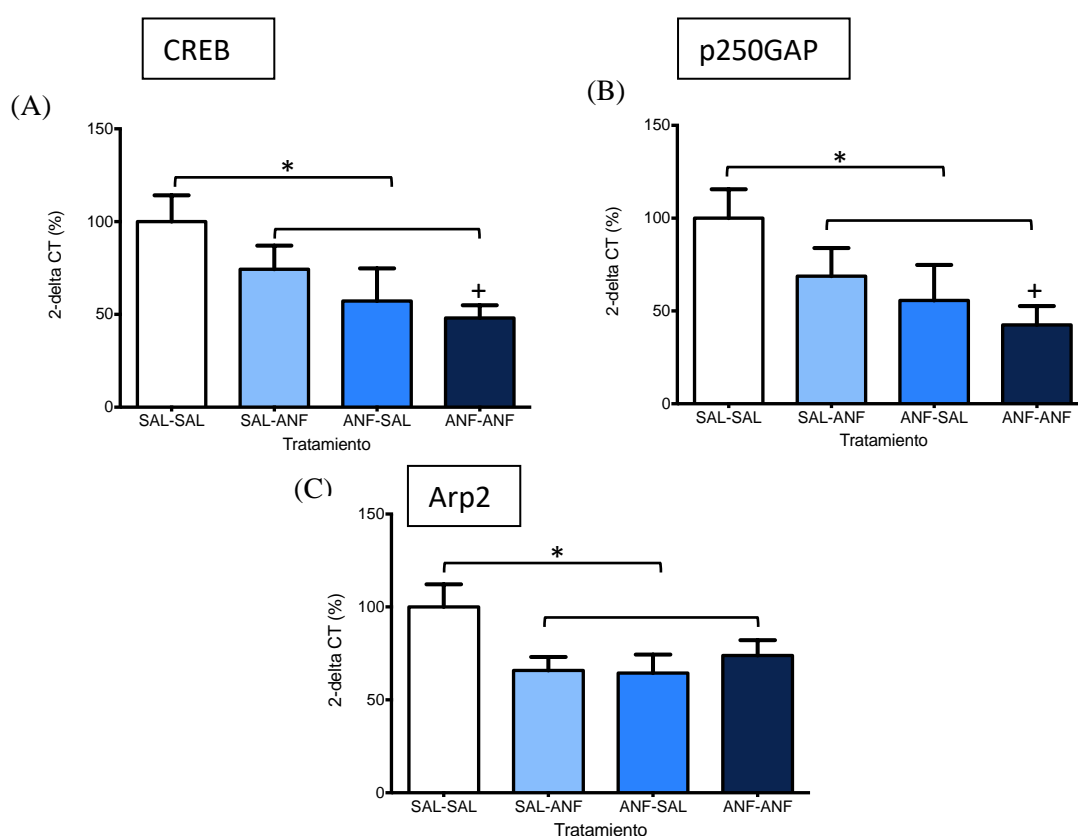


Figura 16. Expresión de (A) CREB, (B) p250GAP y (C) Arp2 según el grupo experimental post periodo de incubación. *Efecto principal $P < 0.05$, + SAL-SAL vs. ANF-ANF $P < 0.05$.

En la Tabla 2 se resume los resultados obtenidos sobre los cambios en la expresión génica de los genes de interés. Estos se muestran según el área cerebral analizada.

Tabla 2. Variaciones en la expresión génica de los genes de interés según el área cerebral analizada.

Gen	Hipocampo			Núcleo accumbens			Estriado dorsal		
	Efecto principal	Efecto pre	Efecto post	Efecto principal	Efecto pre	Efecto post	Efecto principal	Efecto pre	Efecto post
TrkB	-	-	↓	-	↑	-	-	-	-
BDNF	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
CREB	↓	-	-	-	-	-	↓	-	-
p250GAP	-	-	-	-	-	-	↓	-	-
Arp2	-	-	↑	↓	-	-	↓	-	-
Cfl1	-	-	↑	-	-	-	-	-	-

↑, aumenta la expresión del gen; ↓, disminuye la expresión del gen

6.3 Correlaciones

6.3.1 Correlaciones entre la expresión de los genes en estudio

Se exploraron las posibles correlaciones entre los genes que sí difirieron significativamente entre grupos con aquellos que no mostraron diferencias. En la tabla 3 se muestra que en el Hip de los animales expuestos de manera aguda a la anfetamina la expresión de Cfl1 correlacionó positivamente con la expresión de Arp2 (SAL-ANF: $r= 0.589$, $P=0.037$; ANF-ANF: $r= 0.614$, $P=0.029$). En los animales tratados con una única dosis de anfetamina (SAL-ANF) la expresión de Cfl1 en esa misma región correlacionó positivamente con la expresión de p250GAP ($r= 0.602$, $P=0.033$). En los animales tratados con anfetamina a lo largo de todo el experimento (ANF-ANF) se observó una correlación positiva entre CREB y TrkB hipocampal ($r= 0.659$, $P= 0.019$). En el NAc en el grupo ANF-SAL los niveles de TrkB

correlacionaron positivamente con los de Cfl1 ($r=0.766$, $P=0.005$) (Tabla 2). En el Ed, la expresión de Arp2 correlacionó positivamente con la expresión de CREB ($r= 0.840$, $P= 0.001$) y p250GAP de los animales del grupo ANF-ANF ($r= 0.895$, $P= 0.0001$) (Tabla 3).

Tabla 3. Correlaciones entre la expresión de los genes en estudio según el área cerebral y tratamiento.

Hipocampo			
	Grupos	<i>r</i>	<i>P</i>
Cfl1-Arp2	SAL-ANF	0.589	0.037
	ANF-ANF	0.614	0.029
Cfl1-p250GAP	SAL-ANF	0.602	0.033
CREB-BDNF	ANF-ANF	0.773	0.004
CREB-TrkB	ANF-ANF	0.659	0.019
Núcleo accumbens			
	Grupos	<i>r</i>	<i>P</i>
TrkB-Cfl1	ANF-ANF	0.766	0.005
Estriado dorsal			
	Grupos	<i>r</i>	<i>P</i>
CREB-Arp2	ANF-ANF	0.840	0.001

p250GAP-Arp2

ANF-ANF

0.895

0.0001

6.3.2 Correlaciones entre la conducta de los animales y la expresión génica por área cerebral

Se evaluaron las correlaciones entre la locomoción y la expresión de los genes según la región cerebral. La actividad locomotora inducida por el tratamiento en el día 12 correlacionó de manera positiva con la expresión de BDNF en el NAc ($r=0.381$, $P=0.049$). La actividad locomotora inducida por el tratamiento en el día 42, muestra una correlación negativa con la expresión de todos los genes evaluados en estriado dorsal en los animales que recibieron un tratamiento subcrónico con anfetamina sin una re exposición a la droga (ANF-SAL) (BDNF: $r= -0.624$, $P= 0.027$; TrkB: $r= -0.902$, $P=0.0001$; CREB: $r=-0.864$, $P=0.001$; p250GAP: $r=-0.803$, $P=0.003$; Cfl1: $r=-0.782$, $P= 0.004$; Arp2: $r=-0.712$, $P=0.010$).

7 Discusión

En los últimos años, se han realizado esfuerzos de investigación para comprender el desarrollo de la dependencia a sustancias de abuso. Hasta ahora, se sabe que este proceso consta de distintas etapas que van desde un uso esporádico y recreacional a un uso intensificado, sostenido y escalonado, hasta una pérdida del control del consumo (Piazza & Deroche-Gamonet, 2013). Estas etapas son consecutivas pero independientes entre sí en cierta medida, es decir, desarrollar una de ellas es necesario, pero no suficiente para progresar a la siguiente y son dependientes de factores de vulnerabilidad propios de los individuos, tipo de drogas y frecuencia de exposición (Piazza & Deroche-Gamonet, 2013). Además, el consumo induce cambios en diversos circuitos cerebrales, lo que podría explicar el avance paulatino entre una etapa y la siguiente (Ferrario et al., 2005a; Roberts & Koob, 1997). Con el fin de aportar información a este panorama, esta investigación tuvo como objetivo estudiar la respuesta conductual a la anfetamina, así como los cambios en la expresión de algunos genes involucrados con la plasticidad neuronal como TrkB, BDNF, CREB, p250GAP, Cfl1 y Arp2 en el Hip, el NAc y el Ed de ratas Wistar, posterior al desarrollo y la incubación de la sensibilidad conductual por exposición subcrónica a la droga. Se entiende como sensibilización conductual el aumento en la magnitud de los efectos farmacológicos de la droga ante administraciones repetidas (Phillips et al., 2011; Roberts et al., 2007) y como incubación de la sensibilización, una respuesta a la sustancia de abuso igual o mayor a la observada previo a un periodo de retirada (Steketee & Kalivas, 2011).

Con este objetivo se buscó indagar sobre los genes relacionados con los procesos subyacentes al paso de un uso controlado a un uso compulsivo del psicoestimulante anfetamina, utilizando el modelo de incubación de la sensibilización conductual, con un reto farmacológico realizado tras un periodo de 30 días de restricción al psicoestimulante. Los genes estudiados participan en diferentes procesos relacionados con la plasticidad neuronal inducida por las drogas y otros estímulos, incluidos cambios estructurales que involucran la remodelación del citoesqueleto. Hasta donde sabemos, el reclutamiento de algunos de estos genes (i.e., p250GAP, Cfl1 y Arp2) en el desarrollo e incubación de la sensibilización conductual a anfetamina no ha sido estudiado hasta el momento. Además, se buscó establecer asociaciones entre los cambios en la expresión génica y cambios en la locomoción en el campo abierto

antes y después de exponer los animales al fármaco. La evaluación de la actividad locomotora antes de la exposición a la anfetamina en cada sesión permitió estudiar la respuesta anticipatoria condicionada al contexto donde los animales recibieron el fármaco, mientras que la evaluación de la conducta durante los 45 minutos posteriores a la inyección permitió analizar el efecto farmacológico del psicoestimulante. El cambio en la actividad locomotora de los animales es considerado un indicador indirecto de los procesos cerebrales que podrían desarrollarse en respuesta al protocolo de administración de anfetamina (Robinson & Kolb, 2004) y su evaluación se considera el estándar de oro en modelos de sensibilización conductual (Roberts et al., 2007).

Actividad locomotora anticipatoria condicionada

Durante la etapa de desarrollo de la sensibilidad conductual, todos los animales mostraron una reducción de la actividad locomotora a lo largo de las sesiones de 15 minutos de campo abierto previas a recibir el tratamiento (Fig.10 A). Los animales responden a un nuevo contexto (e.g., la caja de campo abierto) con conductas exploratorias dirigidas a la evaluación de riesgo como la locomoción, pero conforme pasan los minutos y la incertidumbre disminuye, también se reduce la locomoción, en un fenómeno conocido como habituación (Brenes et al., 2009) concepto que refiere a la reducción progresiva de una respuesta conductual como consecuencia de una exposición prolongada o repetida a un estímulo (Groves & Thompson, 1970; Poon & Young, 2006) , en este caso la arena del campo abierto. Sin embargo, al analizar por separado la actividad locomotora total a lo largo de los días de exposición al tratamiento, los animales que recibieron ANF mantuvieron una actividad estable que aumentó significativamente en el día 12, siendo siempre mayor que la actividad locomotora de los animales control (Fig.10 B). Estos resultados sugieren que los animales que se exponen repetidamente a la ANF desarrollan una sensibilización condicionada anticipatoria al contexto donde reciben el psicoestimulante. La sensibilización de la actividad locomotora anticipatoria condicionada en respuesta al contexto ocurre a partir de la generación de procesos de aprendizaje asociativo (Anagnostaras et al., 2002). En este caso, el proceso de aprendizaje asociativo es de tipo Pavloviano, donde el campo abierto cumple una función de estímulo neutro que se condiciona por el estímulo incondicionado -i.e., los efectos recompensantes de la inyección del psicoestimulante experimentados en la arena-. El

emparejamiento repetido entre los efectos de la amfetamina y las claves contextuales del campo abierto, inducen la respuesta condicionada que se expresa como una actividad locomotora aumentada durante los 15 minutos previos a la exposición al tratamiento; mientras que como respuesta incondicionada se reconoce la actividad locomotora en los 45 minutos posteriores a la inyección (Fig. 17).

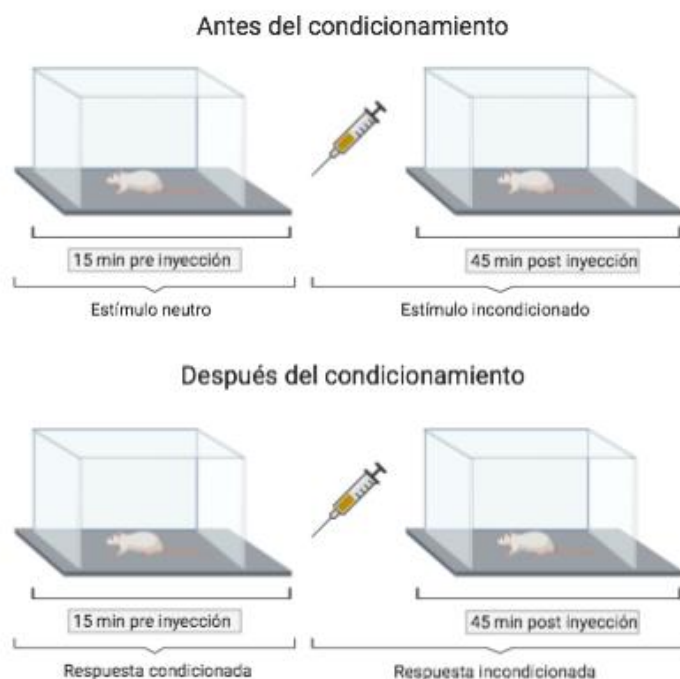


Figura.17. Componentes del proceso de aprendizaje asociativo identificados en el protocolo experimental. En el día 1 de administración del psicoestimulante la exposición previa a un campo abierto de 15 minutos representa el estímulo neutro, mientras que los efectos recompensantes del fármaco en los 45 minutos posterior a la inyección representan el estímulo incondicionado. Posterior al día 2 la subsecuente exposición repetida y simultánea del estímulo neutro y el incondicionado a través de los días (después del condicionamiento) desencadenan una respuesta condicionada en los 15 minutos previos a la exposición al fármaco y una respuesta incondicionada por el efecto recompensante de la amfetamina.

Como se mencionó antes, uno de los principales efectos farmacológicos de la exposición repetida a la amfetamina es la liberación aumentada de DA en el sistema mesocorticolímbico, principalmente en áreas estriatales a partir de terminaciones dopaminérgicas provenientes del ATV (Badiani et al., 2011; Phillips et al., 2008; Utrilla, 2000). Este aumento en la liberación de DA no se da solamente en respuesta a la exposición a la droga, sino también en respuesta

a claves que han sido asociadas al efecto recompensante experimentado (Berridge & Robinson, 1998; Ostlund et al., 2014; Wyvell & Berridge, 2001), lo que se conoce como sensibilización dependiente del contexto (Steketee & Kalivas, 2011). Al exponer a los animales de manera simultánea y repetida a la inyección de anfetamina en la caja del campo abierto, se experimenta el aumento en los niveles de DA en un mismo contexto (Zweifel et al., 2009) y con el tiempo lleva al disparo de las neuronas dopaminérgicas antes de la administración como una respuesta anticipada a la exposición, activada por las claves contextuales condicionadas (Day et al., 2007; Langdon et al., 2018). Además, esta respuesta se potencia cuando el NAc recibe información a través de sinapsis glutamatérgicas desde áreas como la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal (Carmack et al., 2017; Volkow & Morales, 2015), por tanto es un proceso dependiente tanto del aumento en la actividad dopaminérgica, como también de la retroalimentación glutamatérgica de áreas límbicas, pues se sabe que la liberación conjunta de estos neurotransmisores fortalece procesos de plasticidad que podrían explicar, en este caso, el aprendizaje asociativo (Cepeda & Levine, 1998; Day et al., 2007).

Por otra parte, al evaluar la actividad anticipatoria condicionada posterior al periodo de retirada de la droga (día 42), se observó que los animales con un historial de ANF todavía mostraron una actividad locomotora mayor que los animales que recibieron salina antes del periodo de incubación (Fig,11B), lo que sugiere que este condicionamiento (y los procesos relacionados) se mantienen en el tiempo y por tanto se puede concluir que la sensibilización de la actividad anticipatoria se mantiene a largo plazo. En ese sentido, algunos reportes indican que estos efectos pueden mantenerse entre 20 y 60 días (Crombag & Shaham, 2002; Grimm et al., 2001). Se ha establecido que las asociaciones contextuales desarrolladas entre los efectos de las drogas y el medio ambiente pueden inducir cambios críticos de larga duración en los circuitos mesocorticolímbicos que controlan la memoria, la motivación y las emociones (Engelke et al., 2017).

A pesar de que en nuestros resultados se evidencia el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización de la actividad anticipatoria condicionada, resulta pertinente resaltar algunas diferencias observadas en nuestro protocolo y resultados con respecto a la literatura. Por

ejemplo, a pesar de que la actividad locomotora anticipatoria condicionada a lo largo de los días de evaluación fue mayor en los animales que recibieron ANF, es hasta el día 12 en el cual se observa un aumento significativo de la locomoción en este grupo de animales en comparación a las sesiones entre el día 1 y el día 11. Tomando en consideración el concepto antes mencionado de sensibilización, es prudente recomendar el aumento de los días de exposición al fármaco y de esta forma evaluar si a mayor número de exposiciones así también aumentaría de manera progresiva la locomoción, lo que evidenciaría la sensibilización de la actividad anticipatoria condicionada de manera más robusta. Por otra parte, observamos también una diferencia en la adquisición del condicionamiento. Por ejemplo, Rademacher et al. (2006) realizaron el emparejamiento de un mismo contexto con tres inyecciones repetidas de anfetamina (1mg/Kg i.p) en un periodo de cinco días, el cual fue suficiente para observar un aumento significativo en la locomoción de los animales al comparar el día 1 con el último día de exposición, a pesar de realizar menor número de exposiciones al contexto y a la droga, así como del uso de una dosis menor del psicoestimulante. En otro estudio se utilizó una dosis de 4mg/Kg i.p de cocaína y solo se requirieron dos exposiciones al psicoestimulante para que se desarrollara el condicionamiento al contexto y se mantuviera por 28 días (Brabant et al., 2005), mientras que en nuestro caso se utilizaron siete inyecciones. Estos estudios utilizaron el modelo de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL), el cual ha sido el modelo clásico de estudio de los procesos de aprendizaje asociativo, ya que permite que claves contextuales sean asociadas con las propiedades recompensantes de las drogas y a su vez, explica cómo estas claves adquieren la capacidad de evocar y potenciar la búsqueda y el consumo de las sustancias de abuso (Gardner, 2005). Comúnmente en los protocolos de CPL, los animales se exponen al contexto que se busca emparejar e inmediatamente reciben el tratamiento, seguido de exposiciones a un contexto que no se empareja con la droga en estudio (Tzschentke, 2007) de tal forma que los efectos recompensantes de la sustancia se experimentan únicamente y en su totalidad en el contexto emparejado, favoreciendo los mecanismos de aprendizaje asociativo. El modelo animal de desarrollo e incubación de la sensibilización conductual utilizado en este estudio puede ser considerado una combinación de características del CPL. Involucra un protocolo de administración no contingente (administraciones por parte del experimentador) en un mismo contexto, sin embargo, a diferencia del modelo de condicionamiento de lugar, los animales son expuestos en la misma

sesión a 15 minutos al campo abierto antes de recibir la dosis del psicoestimulante. La exposición de los animales 15 minutos antes al contexto donde reciben la inyección pudo haber causado una diferencia en la adquisición de la asociación de los efectos recompensantes de la droga con la caja del campo abierto, tomando en consideración que es hasta aproximadamente de 20 a 25 minutos después que los animales experimentan los efectos farmacológicos de la amfetamina al recibir la inyección (Melega et al., 1995) (Fig. 18). Por tanto, se recomienda que en el planteamiento de futuras investigaciones se utilice un protocolo que evidencie de una manera más robusta la adquisición de la sensibilización e incubación de la actividad anticipatoria condicionada en respuesta a la ANF, al utilizar un mayor número de dosis e integrando protocolos que clásicamente se han utilizado en el estudio del condicionamiento. Al ser procesos que participan en el paso del uso controlado al uso compulsivo de los psicoestimulantes (Berridge & Robinson, 2016) su estudio y explicación toman gran relevancia en la descripción de la neurobiología de este proceso. De hecho, los mecanismos de aprendizaje asociativo que explican el condicionamiento pueden potenciar el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización de la actividad locomotora ante la exposición al fármaco (Anagnostaras et al., 2002; Mattson et al., 2008; Wang & Hsiao, 2003) la cual se explicará más adelante. Además, se describe como uno de los principales desencadenantes de las recaídas (Crombag et al., 2008).

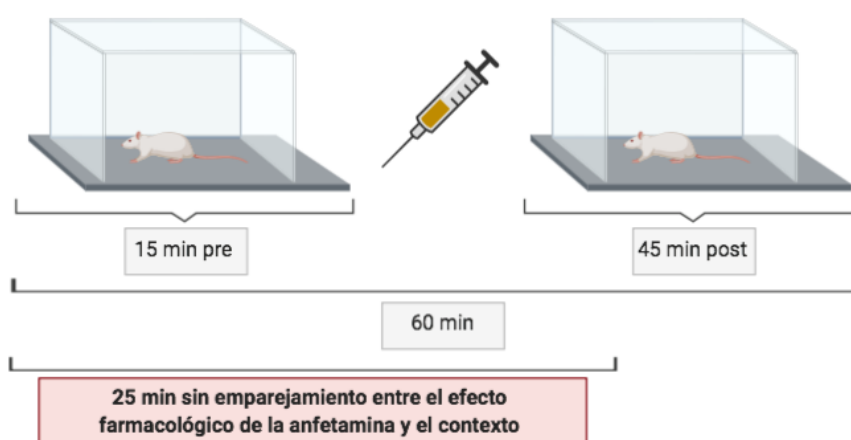


Figura.18. Efecto del tiempo de emparejamiento entre el contexto y los efectos recompensantes del fármaco sobre la magnitud de la respuesta anticipatoria condicionada de los animales. 25 min de los 60 min de exposición al campo abierto no contribuyen al emparejamiento entre el estímulo neutro y el incondicionado.

Actividad locomotora inducida por el tratamiento

En el análisis minuto a minuto de la actividad locomotora inducida por la anfetamina en la fase de desarrollo de la sensibilización conductual, se observó un aumento de la locomoción de los animales a partir del minuto 5 de la prueba y se mantiene esta tendencia al menos hasta el minuto 25, contrario a lo observado en los animales control en donde la actividad locomotora se mantiene constante en valores significativamente menores (Fig. 12A). El cambio en la locomoción en los animales del grupo experimental concuerda con los efectos farmacocinéticos y farmacodinámicos del tratamiento. Según la farmacocinética de la ANF, el tiempo que tarda este psicoestimulante en atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar sus blancos celulares en el sistema mesocorticolímbico de roedores es de aproximadamente 5 a 10 minutos (Melega et al., 1995), aumentando rápidamente la concentración de DA en la hendidura sináptica del sistema mesocorticolímbico, principalmente en el estriado tanto ventral como dorsal (Badiani et al., 2011; Phillips et al., 2008; Utrilla, 2000). Como se describió antes, lo anterior es consecuencia de un bloqueo en la recaptura de DA y por un aumento en la liberación y disponibilidad del neurotransmisor previamente sintetizado y empaquetado en las vesículas de las células presinápticas (Badiani et al., 2011; Fleckenstein et al., 2007; Miranda et al., 2011; Phillips et al., 2008; Robledo, 2008; Utrilla, 2000) al actuar sobre sus blancos celulares el VMAT2 (Robledo, 2008; Stahl, 2013; Sulzer et al., 1995; Zarranz et al., 2011), la MAO (Sulzer et al., 1995) y los DAT (Fleckenstein et al., 2007; Kahlig et al., 2005; Sulzer et al., 1995; Teixeira-Gomes et al., 2015). Este incremento alcanza su pico máximo a los 9 minutos posteriores a una inyección subcutánea y se mantiene por al menos 30 minutos antes de empezar a disminuir, donde las concentraciones del neurotransmisor correlacionan positivamente con la dosis de anfetamina (Cho et al., 1999). La hiperfunción dopaminérgica explica el aumento en la actividad locomotora observada entre los minutos 5 y 25 aproximadamente. Además de los efectos motores, estas vías dopaminérgicas (tanto mesocorticolímbicas como nigroestriatales) también modulan las respuestas recompensantes (Di Chiara, 1998; Hyman et al., 2006). Por tanto, la señalización dopaminérgica mediada principalmente por los receptores D1 en estas áreas cerebrales, permite la traducción del aumento en las concentraciones extracelulares del neurotransmisor en una acción conductual aumentada (Kelly et al., 2008; Xu et al., 2000). Se observó también, una fase de meseta en la locomoción de los animales del grupo experimental, que se mantuvo

desde los 25 min hasta los 43 min aproximadamente, con un decaimiento posterior hasta la finalización de la prueba (Fig.12A). Esta meseta puede deberse a dos fenómenos: por un lado, los blancos celulares de la anfetamina como el DAT, el VMAT2 o la MAO pueden saturarse, de tal forma que la actividad locomotora se mantiene aumentada, pero por el efecto de la dopamina liberada remanente en la hendidura sináptica. La segunda posibilidad (no excluyente) involucra un agotamiento de la liberación de DA del citoplasma y el reservorio vesicular, de tal forma que se deban iniciar procesos de síntesis y transporte de DA en la neurona presináptica para que se libere mayor cantidad del neurotransmisor que pueda contribuir a que siga aumentando de manera progresiva la actividad locomotora. El proceso de síntesis de novo es dependiente de otra maquinaria celular y distintos mecanismos de regulación (Elsworth & Roth, 2009), lo que podría estar reflejándose en el mantenimiento de la actividad locomotora en la etapa de meseta.

La exposición repetida e intermitente a la anfetamina a lo largo de 12 días indujo una sensibilización de la conducta. Los animales del grupo experimental presentaron mayor actividad locomotora que fue incrementándose desde el día 1 hasta el día 6, alcanzando una fase de meseta entre los días 8 y 12 (Fig.12B). La sensibilización conductual puede ser estudiada en dos fases, el desarrollo y la expresión de la sensibilización (Kalivas et al., 1993). Ambas fases involucran cambios en áreas cerebrales que forman parte del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, sin embargo, los mecanismos que explican el desarrollo son distintos a los que explican la expresión de la sensibilización, así como los blancos celulares y moleculares que están involucrados. El desarrollo de la sensibilización se asocia con una hiperfunción del ATV. Esta afirmación ha sido respaldada con investigaciones en las que se estimulan otras áreas cerebrales del sistema de recompensa con psicoestimulantes, pero solo el tratamiento repetido con los fármacos en el ATV permite el desarrollo de la sensibilización conductual (Cador et al., 1995; Perugini & Vezina, 1994). La ANF produce neuroadaptaciones en esta área cerebral que explican la excitabilidad aumentada de las neuronas dopaminérgicas, por ejemplo: el aumento de la actividad de los receptores D1 en las aferencias glutamatérgicas y gabaérgicas (Bonci & Williams, 1996; Kalivas & Duffy, 2002), un aumento en la cantidad de subunidades de los receptores AMPA y NMDA y la potenciación de sus vías de señalización (Carlezon & Nestler, 2002; Giorgetti et al., 2001;

Vezina & Queen, 2000) y una disminución en la actividad de los autorreceptores D2 (Calipari et al., 2014; Tanabe et al., 2004). La actividad aumentada de las neuronas dopaminérgicas del ATV, potencia la función del NAc, entre las cuales está aportar la valencia emocional y motivacional a una respuesta motora conductual (Yager et al., 2015), siendo un área de integración entre la información límbica y el sistema de control motor (Koob & Volkow, 2010; Pierce & Kalivas, 1997). El aumento progresivo en la locomoción observado a lo largo de los días de exposición a la anfetamina, se considera un parámetro indicador de la conducta de búsqueda de la droga en los animales (Steketee & Kalivas, 2011). En la figura 19 se muestra la vía neuronal que media el desarrollo de la sensibilización conductual (para una revisión extensa consultar Steketee & Kalivas, 2011).

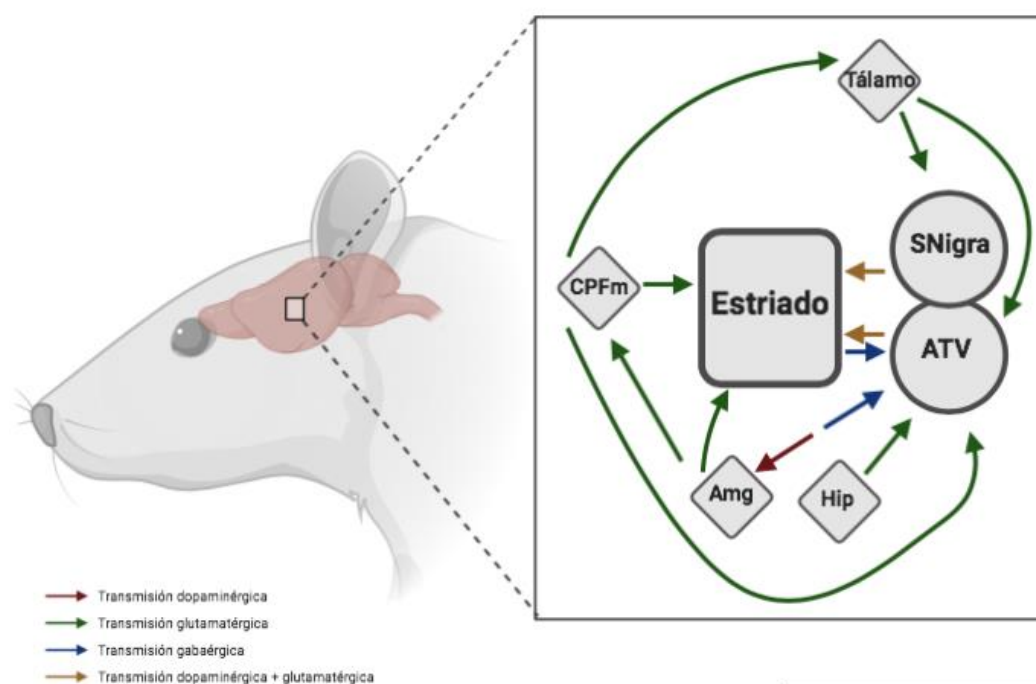


Figura.19. Neurocircuito involucrado en la sensibilización conductual. El estriado es modulado por aferencias dopaminérgicas desde el ATV y la sustancia nigra (SNigra). Además, estas áreas cerebrales son estimuladas indirectamente a través de la amígdala (Amg). El estriado también recibe aferencias glutamatergicas directamente desde la corteza prefrontal medial (CPFm) así como aferencias indirectas a través del tálamo. Finalmente el ATV recibe aferencias moduladoras desde las áreas estriatales, hipocampo, CPFm, Amg y tálamo. Adaptado de Koob & Volkow (2010) y Jeffery D. Steketee & Kalivas (2011).

Respecto a la expresión de la incubación de la sensibilidad, esta se estudió ante la exposición de los animales a un reto farmacológico posterior, 30 días después de la última exposición al fármaco. Se observó que la actividad locomotora de los animales de los grupos SAL-ANF y

ANF-ANF fue mayor en comparación a los animales del grupo SAL-SAL y ANF-SAL, de tal forma que parece ser la exposición aguda a la droga en el día 42, la que determina esta diferencia (Fig. 13A). En la literatura se ha reportado una incubación de la sensibilización conductual ante reexposiciones al fármaco observable 10 días (Valjent et al., 2006), 30 días (Paulson & Robinson, 1995) y hasta un año (Paulson et al., 1991) después de la última exposición a la droga. En estos estudios se consideró una incubación en la sensibilización conductual cuando en el día de reexposición al tratamiento la respuesta conductual se mantuvo igual o significativamente mayor a la observada antes del día del reto farmacológico. En nuestro diseño experimental esto se hubiera evidenciado al observar que en el día 42 los grupos experimentales ANF-SAL y/o ANF-ANF presentaran una locomoción igual o aumentada en comparación a la obtenida en el último día de la etapa de desarrollo de la sensibilización. Sin embargo, este no fue el caso, considerándose un resultado inesperado. Muchos factores como el número de inyecciones, dosis, tiempo de retiro, sexo, edad, genética entre otros, pueden influir en el desarrollo y expresión de la sensibilización conductual (Steketee & Kalivas, 2011). Por ejemplo Choi et al., (2014), realizaron un experimento similar al nuestro, sin embargo en este caso hay una diferencia en la cantidad de exposiciones a la droga en la fase de desarrollo de la sensibilización conductual (5 exposiciones), además de menos días de retirada (14 días) y observaron el desarrollo y la incubación de la sensibilización locomotora con un aumento significativo de la locomoción de los animales con un historial de ANF en el día del reto farmacológico. Nordquist et al. (2008) utilizaron menores exposiciones a la droga y de forma consecutiva, usando dosis mayores del fármaco (2.5mg/Kg), y si observaron una incubación de la sensibilización posterior a 15 días desde la última exposición al fármaco. Por otro lado, algunos estudios reconocen diferencias en la respuesta de los individuos analizados, Dietz et al. (2009) encontraron que únicamente en ratas “altas respondedoras” se desarrolla e incuba la sensibilización y no en todos los sujetos expuestos a dosis repetidas de ANF; de igual forma Scholl et al. (2009) encontraron que del 100% de animales expuestos a un protocolo de dosis repetidas de ANF (2.5mg/Kg) un 62% desarrollaron e incubaron la sensibilización conductual mientras que el porcentaje restante no. En nuestro caso, se encuentran discrepancias con la literatura en la cantidad de dosis utilizadas, el protocolo de administración, así como en el tiempo de retirada el cual se alargó hasta 30 días. Aunado a esto, no se tomaron en consideración características de los animales

que pudieran clasificarlos entre altos y bajos respondedores a la ANF. Aún así, en la literatura se encuentran muchas diferencias entre metodologías lo que puede llevar a que la magnitud, duración e incubación de la sensibilización conductual varíe entre experimentos y así las conclusiones que puedan generarse en estos, por lo que estandarizar los protocolos dependiendo de los objetivos del estudio es de suma importancia.

Por otra parte, de manera descriptiva se pudo observar que la locomoción de los animales que recibieron ANF en el día 1 de tratamiento (2.011 ± 0.099) fue menor a la observada en el día 42 para los animales del grupo SAL-ANF (2.581 ± 0.577). A pesar de que, en ambos casos, estos animales habían sido expuestos a una única inyección de ANF al momento de la medición que se compara, tenían una diferencia importante y es que los sujetos del grupo SAL-ANF habían sido ya evaluados siete veces en el campo abierto. De esta forma, se esperaba observar un proceso de habituación al campo abierto ya que, como se mencionó anteriormente, la habituación puede darse ante exposición prolongada de los sujetos a un mismo contexto o ante exposiciones repetidas a este (Groves & Thompson, 1970; Poon & Young, 2006) lo que indicaría que estos animales no deberían presentar una locomoción mayor en respuesta al fármaco que los animales del grupo ANF en el día 1 de experimentación. Por tanto, nos parece importante tomar en consideración que este resultado pudo haber estado mediado por la codificación de las inyecciones repetidas de salina como un evento estresante. Existe evidencia de que el desarrollo y expresión de la sensibilización conductual en respuesta a psicoestimulantes puede estar facilitada por eventos estresantes, fenómeno conocido como sensibilización cruzada (Burke & Miczek, 2014). Esto se ha evidenciado al observar que animales expuestos a protocolos de estrés desarrollan una sensibilización locomotora en respuesta a un reto farmacológico (Cruz et al., 2012; Haile et al., 2001; Nikulina et al., 2004; Wang et al., 2013). El factor liberador de corticotropina (CRF por sus siglas en inglés) es la hormona que regula la respuesta autónoma, neuroendocrina y conductual al estrés (Briand & Blendy, 2010) y al mismo tiempo, se asocia con la respuesta a la administración de drogas psicoestimulantes (Goeders & Guerin, 1996; Swerdlow et al., 1993). Su actividad se extiende a áreas cerebrales como la CP, el NAc, el Hip, la Amg y el ATV (Trainor, 2011). Entre sus acciones, CRF modula la actividad de las neuronas del ATV al potenciar la actividad de los receptores NMDA y AMPA (Fitzgerald et al., 1996; Saal et

al., 2003; Ungless et al., 2003), además de atenuar el papel inhibitorio de los receptores D2 y GABA-B de las neuronas dopaminérgicas (Beckstead et al., 2009). De esta forma, se potencia la liberación de DA en áreas como el NAc, neuroadaptación observada también ante la exposición repetida a psicoestimulantes. Por tanto, la exposición a factores estresantes sería un estímulo que también inicia los procesos que median el desarrollo y expresión de la sensibilización conductual. Lo anterior sugiere que, a través de mecanismos similares, el estrés podría ser un factor que aumente la vulnerabilidad de los individuos al desarrollo de una conducta aumentada ante la exposición aguda de la sustancia de abuso sin que haya habido una experiencia previa con el psicoestimulante (Cruz et al., 2012). En otros protocolos de desarrollo e incubación de la sensibilización conductual con un número menor de inyecciones de salina en los sujetos control se encontraron resultados contradictorios, Nordquist et al. (2008) observaron como en nuestro caso, un aumento en la locomoción de los animales con un historial de salina y un reto farmacológico con anfetamina pero en menor magnitud; mientras que Choi et al. (2014) no observaron este aumento en la actividad locomotora de los animales control. Por esto, es relevante tomar en consideración en las conclusiones de esta investigación el efecto que pudieran tener las inyecciones repetidas de salina sobre los animales control.

Evaluación de la actividad locomotora como indicador indirecto de neuroadaptaciones

Finalmente, es importante rescatar la relevancia que tiene el estudio de la locomoción en el campo abierto como indicador del desarrollo e incubación de la actividad anticipatoria condicionada, así como de los procesos de desarrollo e incubación de la sensibilización conductual en respuesta a la anfetamina. Como se discutió, estos procesos son consecuencia de cambios neuronales en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que se desarrollan en el tiempo y pueden mantenerse o potenciarse. La sensibilización conductual en respuesta al fármaco recibe mucha atención en la literatura pues tiene relación con otras conductas claves relacionadas con la dependencia, como las ansias de consumo (Kalivas et al., 1998), de tal forma que ha sido reconceptualizada como una sensibilización del valor de incentivo de consumir la sustancia de abuso. Las adaptaciones del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico en respuesta a la exposición repetida a las drogas, llevan a un aumento en el valor de incentivo de la sustancia (Robinson & Berridge, 1993), lo que modula el

despliegue de conductas de búsqueda y deseo del fármaco reflejado como una hiperlocomoción (Robinson & Berridge, 2008). La sensibilización conductual ha sido observada en seres humanos y de igual forma se ha descrito como moduladora de conductas de ansias de consumo (Boileau et al., 2006; Leyton, 2007). Así mismo, el desarrollo e incubación de la sensibilización de la actividad anticipatoria condicionada ha sido estudiada principalmente por su papel en procesos de recaída, ya que los mecanismos detrás del aprendizaje asociativo entre el contexto y los efectos recompensantes de los fármacos facilitan y disparan las conductas de búsqueda. En estudios clínicos se muestra que la exposición de sujetos a estímulos ambientales asociados con el consumo de la sustancia de abuso, despliega conductas de ansias de consumo que pueden promover la recaída (O'Brien et al., 1992).

Expresión génica en hipocampo

En el hipocampo, se observó un efecto post en la expresión del receptor TrkB regulándose a la baja (Fig.14A). Este resultado podría tener dos interpretaciones, sin embargo, estas deben ser tomadas con cautela ya que, la disminución observada en la expresión del receptor es un resultado estadísticamente significativo pero leve. La primera, podría indicar que una exposición aguda a la droga lleva a una disminución transitoria de la producción del receptor. Se han realizado investigaciones *in vitro* en las cuales se observa que el receptor TrkB puede desensibilizarse en respuesta a una mayor actividad de moléculas de BDNF (Carter et al., 1995; Frank, 1996). TrkB está usualmente co-localizado con BDNF en el sistema nervioso central (Drake et al., 1999), pero se sabe que esta vía de señalización podría iniciarse a partir de una comunicación tanto autocrina como paracrina (Kuczewski et al., 2009). Si la disminución en la expresión de TrkB hipocampal estuviera regulada por una comunicación autocrina de BDNF se esperaría un incremento en la expresión de dicha neurotrofina en las células hipocampales, sin embargo, en nuestro caso no observamos un cambio significativo de la expresión de BDNF en esta área cerebral. Por tanto, el resultado obtenido sugiere que una menor expresión del receptor podría ocurrir en respuesta a un incremento en la producción y liberación de BDNF que provienen de otras áreas cerebrales y que se comunica paracrinamente con las células hipocampales, como por ejemplo desde la corteza prefrontal (McGinty et al., 2010). La segunda posibilidad, es que la expresión del receptor TrkB

aumente rápidamente ante la exposición aguda a la ANF, llevando a mecanismos de retrocontrol negativo sobre su expresión de tal forma que, por la ventana de tiempo utilizada en este experimento entre la inyección de ANF y el sacrificio de los animales, no observamos este aumento sino la disminución compensatoria. Sin embargo, son pocos los estudios que han evaluado los niveles de TrkB y BDNF en el hipocampo que nos permitan contrastar estas hipótesis. Además, los hallazgos principales son bajo un efecto de exposiciones repetidas a la sustancia de abuso. Por ejemplo, Shen y colaboradores (2006), encontraron un aumento en la expresión de TrkB en respuesta a un protocolo de exposición repetida a ANF por cinco días de forma alterna. Nibuya y colaboradores (1995), no observaron una variación de los niveles de BDNF después de 10 días de exposición al psicoestimulante cocaína. Por su parte, los efectos de una administración aguda de psicoestimulantes en la expresión de TrkB y BDNF en Hip sí han sido descritos para cocaína; Filip et al (2006) encontraron al igual que en nuestro caso una disminución de la expresión de TrkB sin un cambio en los niveles de su ligando BDNF ante una única exposición a 10 mg/Kg i.p de cocaína y utilizando una ventana de tiempo (1 hora) similar a la nuestra desde la inyección hasta el sacrificio. En todo caso, una posible disminución en la densidad del receptor para BDNF podría suponer también una disminución transitoria en la actividad de esta vía de señalización. Esta conclusión se respalda con el hecho de que en los animales del grupo ANF-ANF se observó una correlación positiva entre la expresión de TrkB y BDNF, así como de la expresión de TrkB y CREB. Ambos genes son regulados intrínsecamente por la actividad de BDNF sobre el receptor TrkB (Carlezon et al., 2005; Johannessen et al., 2004; McGinty et al., 2010), por tanto una menor actividad de esta vía de señalización podría explicar la relación en la dinámica de expresión entre estos genes

La vía celular iniciada por el receptor TrkB, regula diversos blancos citoplasmáticos y nucleares relacionados con la diferenciación y supervivencia celular y procesos de plasticidad funcional y estructural (Kowiański et al., 2018). El Hip por su parte, desempeña un papel fundamental en el reconocimiento y codificación de las claves contextuales tanto espaciales como temporales (Izquierdo et al., 2001; Moses et al., 2002), procesos que podrían eventualmente ser importantes en el desarrollo y expresión de la sensibilización conductual a los psicoestimulantes (Hinson & Poulos, 1981; Lodge & Grace, 2008; Steketee & Kalivas,

2011). Hay estudios que identifican una relación entre la actividad de la vía de señalización orquestada por TrkB y el desarrollo del condicionamiento al contexto donde los sujetos reciben la sustancia de abuso. La inyección hipocampal de un inhibidor de receptores Trk (K-252a), interrumpe la generación del condicionamiento de preferencia de lugar ante el emparejamiento de un contexto con la exposición a ANF, concluyendo que estos receptores son críticos en mediar las neuroadaptaciones necesarias para inducirlo (Shen et al., 2006). Por su parte, Rademacher y colaboradores (2006) encontraron que la generación de este mismo condicionamiento se acompañó de un aumento en la expresión de receptores TrkB en el giro dentado y las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. De esta forma los cambios en la expresión de TrkB parecen ser necesarios para iniciar el desarrollo de procesos de aprendizaje asociativo que lleven al emparejamiento entre el contexto y los efectos recompensantes de la ANF. Por tanto, se podría pensar que el desarrollo e incubación de la sensibilización de la actividad anticipatoria condicionada observada en los animales expuestos a la ANF en nuestro experimento está relacionada a los cambios transitorios en la expresión de TrkB observados en el Hip donde inicialmente se da una disminución de su expresión, pero posiblemente ante administraciones repetidas de la ANF sus niveles vuelvan a aumentar. Resultado que no estamos observando en nuestros datos, posiblemente por el tiempo (30 días) de retirada entre las exposiciones repetidas al fármaco y el día de sacrificio.

Por otro lado, se encontró una disminución en la expresión del ARNm de CREB hipocampal como un efecto principal de la exposición de los animales a la ANF, con una diferencia significativa entre los grupos SAL-SAL y ANF-ANF (Fig. 14B). CREB es un regulador clave de las respuestas conductuales ante la exposición a drogas de abuso (Carlezon et al., 2005). Específicamente en el Hip, variaciones en los niveles de expresión de CREB, al igual que TrkB, participan en la consolidación de memorias de asociación a los contextos donde los animales fueron expuestos a las drogas (Kutlu & Gould, 2016). La activación de CREB en el Hip es un elemento esencial en esta codificación regulándose su expresión y actividad transitoriamente a la alta en respuesta a nuevos contextos (Moncada & Viola, 2006; Tropea et al., 2008; Valzachi et al., 2013; Winograd & Viola, 2004). En relación con lo anterior, se ha descrito que CREB disminuye en el Hip una vez que el contexto se ha vuelto familiar (Moncada & Viola, 2006). Por lo tanto, una disminución en la expresión de CREB tras la re

exposición a ANF en animales previamente sensibilizados sugiere que este pudo haber participado en la consolidación y recuperación de las memorias asociativas vinculadas al contexto observadas en la conducta de los sujetos experimentales. Dado que estas asociaciones ya fueron establecidas al momento del reto, su expresión se vería disminuida. Featherby y colaboradores (2008) encontraron el mismo resultado, reportando menores niveles del ARNm de CREB ante una exposición de anfetamina por 10 días con o sin un reto farmacológico nueve semanas después de la última administración.

La expresión de Cfl1 y Arp2 por su parte, aumentó en el Hip ante una exposición aguda de los animales a la ANF como un efecto post (Fig. 14 C y D). De hecho, en los animales de estos grupos la expresión de Cfl1 correlaciona positivamente con la de Arp2. Las proteínas Cfl1 y Arp2 participan en la remodelación del citoesqueleto (Chan et al., 2009), siendo esta una condición necesaria para la plasticidad estructural. Por lo tanto, según nuestros resultados, una única exposición a la anfetamina podría ser suficiente para reclutar mecanismos de remodelación de la arquitectura celular en el Hip con la participación de estas proteínas de unión a la actina, ya que, se sabe que los psicoestimulantes propician procesos de plasticidad estructural (Shen et al., 2009; Toda et al., 2006). Sin embargo, la regulación a la alta en la expresión del ARNm que codifica para dichas proteínas parece ser transitorio, pues en los animales con exposición previa a la anfetamina la expresión de Cfl1 y Arp2 no presentó diferencias con respecto al grupo control. La regulación de estas moléculas podría estar orquestada por cascadas de señalización iniciadas por varios receptores, entre ellos los receptores metabotrópicos de glutamato (Sanderson et al., 2016) y receptores ionotrópicos de glutamato como los NMDA (Bosch et al., 2014) neurotransmisor liberado a nivel hipocampal en respuesta a diferentes estímulos, entre ellos la exposición a psicoestimulantes (Gass & Olive, 2008; Raudensky & Yamamoto, 2007; Rocher & Gardier, 2001). Así también puede estar bajo la regulación de receptores metabotrópicos de DA (Borovac et al., 2018) neurotransmisor mencionado ampliamente en esta discusión por su participación en la respuesta a la administración de ANF. Hasta hoy, no existe literatura enfocada en la expresión del ARNm de Cfl1 y Arp2 en Hip en respuesta a drogas psicoestimulantes, por lo que estos resultados preliminares adquieren gran relevancia. Aún así, son necesarios más estudios para comprender el papel de las proteínas Cfl1 y Arp2 en la plasticidad neural inducida por

psicoestimulantes y de su posible relación con los cambios conductuales observados en la presente investigación.

Por último, en los animales del grupo SAL-ANF se observó una correlación positiva entre la dinámica de expresión de Cfl1 con la de p250GAP. p250GAP disminuye la actividad de moduladores importantes en procesos de remodelación dendrítica como las RhoA GTPasas (Nakazawa et al., 2008; Taniguchi et al., 2003) las cuales a su vez regulan la actividad de Cfl1 y Arp2 (Bamburg & Wiggan, 2002). Por su función, se esperaba una correlación inversa entre la expresión de los genes Cfl1 y p250GAP, sin embargo, este no fue el resultado obtenido. p250GAP también es una proteína que está en estrecha relación estructural y funcional con los receptores NMDA (Nakazawa et al., 2008; Taniguchi et al., 2003), por lo que un aumento en la expresión y exposición en la membrana de mayor cantidad de receptores NMDA podría concomitantemente cambiar la expresión de p250GAP. Es esperable que la ANF induzca el reclutamiento de más receptores NMDA como parte de los procesos de plasticidad estructural que desencadena (Huang et al., 2009), por lo que esta congruencia de mecanismos distintos explicaría la dirección de la correlación obtenida entre la expresión de p250GAP con Cfl1. Sin embargo, es importante resaltar que ni el desarrollo e incubación del condicionamiento ni tampoco el desarrollo de la sensibilidad conductual en respuesta a ANF observados en este experimento, parecen depender de variaciones en la expresión de p250GAP en el Hip, pues no hubo cambios significativos en los promedios de expresión de dicho gen que fueran específicos de alguna de las fases estudiadas.

En conclusión, parece ser que los cambios en el perfil de expresión en el Hip responden principalmente a la exposición aguda de los animales a la ANF o a cambios transitorios en la regulación de estos genes. La variación en la expresión de TrkB, Cfl1 y Arp2 podrían estar evidenciando que la expresión de algunas proteínas que participan en el inicio de la vía de regulación propuesta (Fig. 8), como el receptor TrkB, disminuyan rápidamente de una manera transitoria como producto de un mecanismo de retrocontrol negativo, pero que ante administraciones repetidas a la ANF aumente como parte de las neuroadaptaciones descritas en la literatura y que no logramos observar en nuestro experimento, posiblemente, debido a la cantidad de días de retirada de la droga. Por el contrario, dado que la expresión de genes

relacionados con la modificación del citoesqueleto (e.g., Cfl1 y Arp2) aumenta en respuesta a la ANF, se podría suponer que sus productos funcionales quedarán disponibles a nivel citoplasmático para incorporarse dentro de la maquinaria de remodelación estructural de la neurona. Tras la administración repetida la regulación a la alta en la expresión de dichos genes parece ya no ser necesaria. En el caso de CREB, el cambio en su expresión se da de una forma más generalizada por el psicoestimulante, pero parece que su disminución responde a procesos plásticos involucrados en el reconocimiento de contextos familiares. Por último, se puede inferir que los cambios en los genes mencionados en el Hip son necesarios para el inicio y consolidación del desarrollo de memorias asociativas entre el contexto y el efecto farmacodinámico de la ANF.

Expresión génica en núcleo accumbens

Los cambios en la expresión de los genes de interés en el NAc, parecen estar involucrados principalmente en la fase de desarrollo de la sensibilización conductual. Por ejemplo, se observó un efecto pre hacia el incremento tanto en la expresión de TrkB (Fig. 15A) como de su ligando BDNF (Fig.15B), lo que sugiere que el protocolo de exposición subcrónica a la anfetamina y/o el tiempo de incubación induce un cambio en la expresión de estos genes. Una mayor expresión del receptor TrkB podría activar cascadas de señalización celular iniciadas por BDNF producido en el NAc (Choi et al., 2006; Graham et al., 2007) u otras fuentes cerebrales como el ATV y la CPF (Anthony Altar et al., 1997; Guillin et al., 2001; Seroogy et al., 1994). En el NAc la sobre-estimulación dopaminérgica por la exposición a la ANF podría inducir el aumento en la producción de BDNF local. Algunos estudios han descrito este efecto donde, además, el BDNF producido potencia la activación de cascadas de señalización dopaminérgicas constituyéndose en una retroalimentación positiva. (Iwakura et al., 2008; Williams & Undieh, 2009). Este aumento en la expresión de la neurotrofina también puede estar relacionado con la sobreestimulación serotoninérgica causada por los psicoestimulantes (Mattson et al., 2004). La sobreexcitación dopaminérgica, serotoninérgica y de factores de crecimiento podrían, actuando juntas, potenciar la participación de esta área cerebral en la etapa descrita.

La estimulación de la cascada de señalización TrkB/BDNF ha sido descrita en varios estudios como facilitadora de neuroadaptaciones en el NAc relacionadas con el desarrollo de la sensibilización conductual ante drogas psicoestimulantes (Bahi et al., 2008; Filip et al., 2006b; Graham et al., 2009) y también por su participación en el mantenimiento o potenciación de estas adaptaciones por periodos de 9 días (Zhang et al., 2015) y hasta 90 días (Grimm et al., 2003) desde la última exposición a la sustancia de abuso. Su actividad se mantiene a lo largo de los días posiblemente producto de la alta demanda del ligando en la fase de desarrollo de la sensibilización conductual. Estas neuroadaptaciones se podrían reflejar eventualmente en un cambio conductual en los sujetos, al hacerlos más vulnerables a presentar conductas de búsqueda de la droga y episodios de recaídas tiempo después de la última exposición a la sustancia de abuso. Estudios donde se evaluaron ratones knockout para BDNF mostraron un desarrollo menor y más tardío de la sensibilización locomotora a cocaína (Horger et al., 1999; Huang et al., 2011), lo que evidencia su participación en el desarrollo de la sensibilización. Otros investigadores evidenciaron una relación similar al utilizar ratones modificados genéticamente para no expresar el receptor TrkB. Observaron que los animales no desarrollaron la sensibilización locomotora posterior a la exposición a la droga, la cual demuestra que la activación del receptor es necesaria para el desarrollo de la sensibilización conductual (Crooks et al., 2010).

En concordancia con este resultado, se observó una correlación positiva entre la expresión de TrkB y Cfl1 en los animales del grupo ANF-SAL. La vía de señalización activada por la unión de BDNF a su receptor, tiene un rol ampliamente descrito sobre la plasticidad estructural en el NAc de sujetos expuestos a psicoestimulantes (Russo et al., 2010), a partir de la activación de varias cascadas intracelulares en las que intervienen las MAPK, PI3K y la PLC γ llevando a la remodelación del citoesqueleto (Williams & Undieh, 2009). La mayoría de la literatura reporta un aumento en la plasticidad estructural acompañado de cambios en la densidad de espinas dendríticas de las neuronas del NAc (Ferrario et al., 2005a; Y. Li et al., 2004) y un aumento en las ramificaciones dendríticas y su longitud (Singer et al., 2009). La función de la proteína Cfl1 por su parte, consiste en regular la dinámica de los filamentos de actina y, según su concentración, también regularla estabilización o fragmentación de ellos (Bamburg & Wiggan, 2002; Van Troys et al., 2008). Por lo anterior,

podría suponerse que una mayor activación de vías de señalización que potencian la remodelación del citoesqueleto ocurra de la mano con cambios en la dinámica de expresión y actividad de proteínas que ejecuten estos cambios. La participación de Cfl1 en la plasticidad estructural en respuesta a la exposición a ANF ha sido muy poco estudiada, se han reportado resultados en los que la administración aguda o exposiciones repetidas a psicoestimulantes como cocaína, alteran los niveles o fosforilación de Cfl1 en el NAc (Dietz et al., 2012; Shen et al., 2006; Toda et al., 2006). Podría ser que las vías de señalización activadas por TrkB/BDNF participen en la modulación de las proteínas reguladoras de Cfl1 (e.g. LIMK y Slingshot) (Van Troys et al., 2008) estimulando su actividad. Sin embargo, se requieren más investigaciones para tratar de dilucidar la relación entre la expresión de estas proteínas, principalmente porque la actividad de Cfl1 depende no solamente de su concentración y fosforilación sino también de otras proteínas de unión a la actina y la concentración de monómeros disponibles (Bamburg & Wiggan, 2002; Bernstein & Bamburg, 2010). Además, el resultado obtenido no indica un cambio significativo en la expresión de Cfl1, de tal forma que lo que este resultado sugiere es que podría haber una relación entre la dinámica de expresión de TrkB que si es modulada por la exposición subcrónica a ANF, con la expresión y actividad de Cfl1.

Por otra parte, se observó una disminución significativa en la expresión de Arp2 en el NAc por la exposición a la ANF (Fig. 15C). Arp2 es una ABP que se encarga de unir monómeros de actina en ángulos de 70° en filamentos ya existentes, de tal forma que permite aumentar las ramificaciones del citoesqueleto (Dosremedios et al., 2003) participando en procesos de plasticidad estructural. Tomando en consideración los cambios estructurales que se han observado en el NAc ante exposición a psicoestimulantes y por la función de la proteína Arp2, el resultado obtenido sugiere que podríamos estar observando un efecto compensatorio ante el aumento en su producción producto de la exposición a ANF, que lleve a la reducción compensatoria de los niveles del ARNm pero que la actividad de la proteína se mantenga a nivel citoplasmático. Sin embargo, los pocos estudios que se encuentran en la literatura en donde han evaluado los niveles y actividad de estas ABPs en el NAc tienen diversas interpretaciones. Singer y colaboradores (2016) observaron una disminución de Arp2 en el NAc, ante exposición a ANF y un periodo de retirada de una semana, acompañadas de una

disminución en el tamaño de las espinas dendríticas. Toda y colaboradores (2006) por su parte, no describen cambios en el complejo Arp2/3, ante una exposición de los animales a siete días de tratamiento con anfetamina y un periodo de retirada de tres semanas, lo cual es relacionado a cambios en la dinámica del ciclado de la actina producto de la actividad de otras ABPs generando formaciones del citoesqueleto más lineales. Ante esto es importante realizar investigaciones que permitan evaluar cambios en la plasticidad estructural, de tal forma que se pueda determinar si las variaciones en la expresión de Arp2 responden a un aumento o disminución en la reorganización del citoesqueleto.

En conclusión, el NAc participa en la fase de desarrollo de la sensibilidad conductual, de la mano con una potenciación de la expresión de TrkB y BDNF, lo que podría a su vez potenciar la vía de señalización intracelular relacionada. Los animales del grupo experimental con una mayor actividad locomotora al final de la fase de desarrollo de la sensibilización conductual mostraron una correlación positiva con la expresión de BDNF, resultado que respalda esta conclusión. Por su parte, a pesar de que se observó una disminución significativa de Arp2 en esta área cerebral, el cambio no parece ser dependiente específicamente de alguna de las fases estudiadas, sino más bien proponemos que el gen que codifica para Arp2 es sensible en general a la exposición a ANF, participando en diferentes fases del desarrollo de la dependencia a anfetamina posiblemente ejecutando cambios en la dinámica estructural del citoesqueleto.

Expresión génica en estriado dorsal

La expresión del factor de transcripción CREB se regula a la baja por la exposición de los animales a la ANF, con una diferencia significativa en la expresión de este factor de transcripción en los sujetos que fueron re-expuestos a una dosis del psicoestimulante en el día 42 (ANF-ANF) en comparación con el grupo control (Fig. 16A). Dado que la evidencia en la literatura muestra que la exposición de animales a inyecciones repetidas o sesiones prolongadas de autoadministración de cocaína o ANF eleva los niveles de CREB fosforilada en esta área cerebral (Hollander et al., 2010; Lee et al., 2008; Turgeon et al., 1997), se podría suponer que una sobreexcitación en la función de la proteína CREB cause una retroalimentación negativa en su producción, disminuyendo los niveles de ARNm de CREB;

este mecanismo ha sido evidenciado en otras áreas cerebrales como el NAc (Barrot et al., 2002; Carlezon et al., 1998) de tal forma que se observen menores niveles de ARNm pero la actividad como proteína funcional activa se mantenga. De hecho, al no observarse un cambio significativo en la expresión de los genes de BDNF y TrkB en esta área cerebral, cuyos productos funciones regulan la expresión y actividad de CREB (Johannessen et al., 2004), se podría pensar que su regulación podría atribuirse a otros moduladores como el neurotransmisor DA y su actividad sobre su receptor D1. Este activa cascadas de señalización que aumentan la actividad de la proteína quinasa A, la cual fosforila los residuos de serina¹³³ de CREB y permite su actividad como factor de transcripción (Konradi & Cole, 1994). Es importante recordar que el Ed es un área cerebral que recibe una gran cantidad de aferencias dopaminérgicas, lo que causa una sobreestimulación ante la exposición a sustancias de abuso (Grace, 1995; Overton & Clark, 1997). Varias investigaciones han demostrado la participación de CREB en el Ed referente al despliegue conductual inducido por drogas psicoestimulantes; Sakai y colaboradores (2002) utilizaron animales que sobre expresaban esta proteína, evidenciando una función en la respuesta conductual de los animales a repetidas dosis de cocaína, pues observaron una disminución significativa de la actividad locomotora en respuesta al psicoestimulante. Por otro lado, otros estudios proponen que la inhibición de CREB potencia la sensibilización locomotora en animales expuestos a cocaína (Fasano et al., 2009). Basado en esta literatura y en nuestros resultados, parece que la disminución en los niveles del ARNm de CREB podría ser una condición necesaria tanto para la activación locomotora como la sensibilización conductual de los animales observada ante la exposición repetida a la ANF.

La misma tendencia se observó en la expresión de p250GAP. Los niveles del ARNm de esta proteína disminuyeron en todos los animales que fueron expuestos a ANF. Además, se encontró una expresión significativamente menor en los sujetos que mayor exposición tuvieron a la sustancia de abuso (ANF-ANF) en comparación al grupo control (SAL-SAL) (Fig. 16B). La sobreestimulación de la actividad de CREB por su fosforilación, podría explicar el cambio observado en la expresión de p250GAP en la misma dirección. Cuando CREB se encuentra fosforilado regula la transcripción de una gran cantidad de genes, entre ellos la secuencia que codifica para el microARN-132 (Im & Kenny, 2012; Shaltiel et al.,

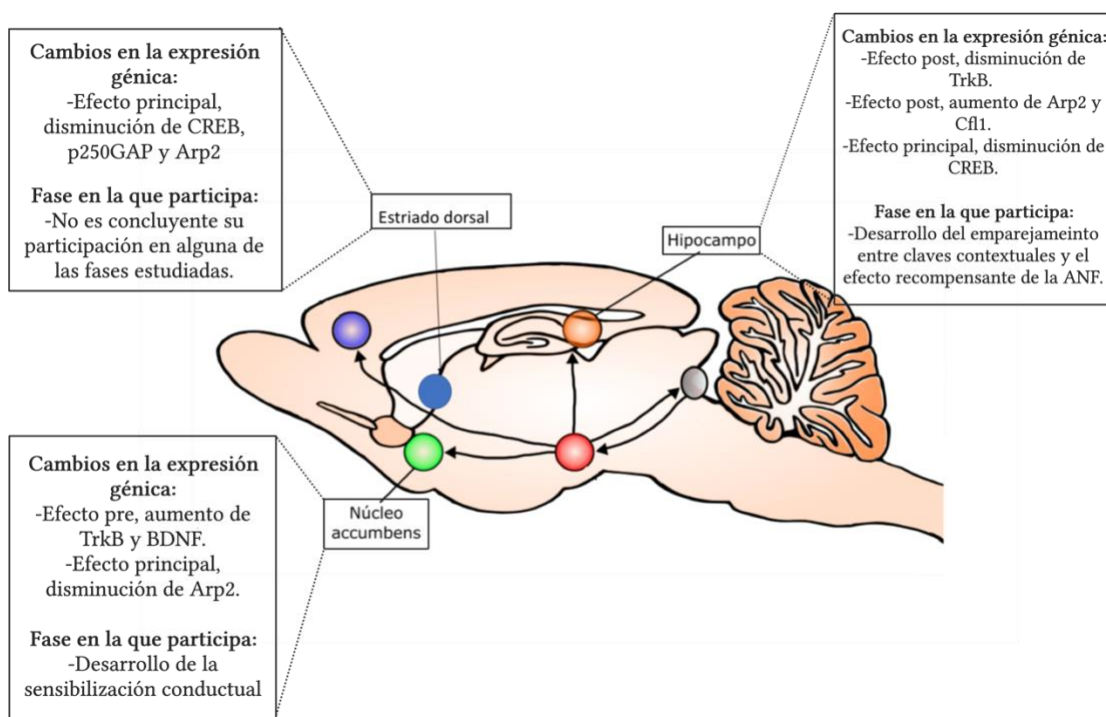
2013) el cual es un regulador posttranscripcional que disminuye los niveles de ARNm de p250GAP (Hansen et al., 2010; Impey et al., 2010; Wayman et al., 2008). Como se mencionó anteriormente, p250GAP es un importante regulador negativo de la actividad de algunas proteínas de unión a la actina, entre ellas Cfl1 y Arp2, por tanto, se podría esperar que al observarse una disminución en los niveles de p250GAP se potencien procesos de remodelación dendrítica en las células del Ed. Esta es la primera vez que se describe una participación de esta proteína en respuesta a la ANF, sin embargo, para poder obtener más información sobre su función deberán llevarse a cabo estudios que involucren la medición de los niveles de las proteínas presentes en las células y su estado de activación, así como análisis de plasticidad estructural en células estriatales.

La expresión de Arp2 por su parte, disminuyó significativamente en todos los animales expuestos en algún momento a la ANF (Fig. 16C). Además, la disminución en su expresión tuvo una correlación positiva con la dinámica de expresión de los genes antes discutidos, CREB y p250GAP en los animales del grupo ANF-ANF. Los cambios en la expresión de esta proteína de unión a la actina con funciones reguladoras sobre la dinámica del citoesqueleto tienen dos posibles explicaciones: la primera es que se regule a la baja con una disminución también en su función como proteína funcional, lo que llevaría a una disminución en la plasticidad estructural en esta área cerebral y la segunda es que disminuya su expresión como un mecanismo compensatorio ante una sobre estimulación de su función proteica, es decir, que a pesar de que disminuye su expresión se mantiene la actividad proteica conduciendo a la remodelación del citoesqueleto. Esta última posibilidad podría verse apoyada por nuestros resultados, en donde la disminución en la expresión de p250GAP explicaría un aumento en la actividad de esta proteína de unión a la actina, dada su función reguladora como GTPasa (Nakazawa et al., 2008; Taniguchi et al., 2003). No existe información en la literatura que muestre cambios en la expresión de Arp2 en el Ed, sin embargo, el resultado obtenido es similar a lo observado en el NAc en este experimento. Tomando en consideración que tanto el NAc como el Ed forman parte de áreas reguladoras de las respuestas motoras y del componente motivacional de estas (Haber & Calzavara, 2009) y que han sido ampliamente implicadas en la regulación de conductas relacionadas al desarrollo de dependencias (Lobo & Nestler, 2011; Yager et al., 2015), el resultado obtenido

se presenta como un primer acercamiento para explorar la participación de las proteínas de unión a la actina en estas áreas cerebrales en la respuesta a la ANF. Lo anterior a partir del conocimiento obtenido en esta investigación, al mostrarlas como sensibles al tratamiento con este psicoestimulante. Para esto serán necesarias investigaciones en donde pueda estudiarse el resultado final de su actividad sobre la plasticidad, según los cambios observados en la expresión de su ARNm.

En resumen, los cambios observados en la expresión génica en el Ed no parece que respondan a alguna de las fases analizadas particularmente, ni nos permiten concluir con claridad si participan en el desarrollo o incubación de la sensibilización de la actividad anticipatoria condicionada o en el desarrollo de la sensibilización conductual en respuesta a la ANF. La información obtenida muestra más bien, que genes como CREB, p250GAP y Arp2 son sensibles en general a la exposición de los animales al tratamiento. Esto a diferencia de lo observado en Hip y NAc. Sin embargo, los resultados obtenidos al correlacionar la actividad locomotora de los animales con la expresión génica mostraron que en el grupo ANF-SAL se observa una correlación negativa entre la actividad locomotora del día 42 posterior a la inyección de la ANF con la expresión de todos los genes evaluados, de tal forma que podría inferirse que la exposición repetida a la ANF con un período de retirada de 30 días modifica, en algunos animales más respondedores al tratamiento, la dinámica de expresión génica en esta área cerebral y que estos cambios sean dependientes de factores de vulnerabilidad entre los sujetos.

Finalmente, la figura 20 muestra un resumen de los resultados obtenidos en la presente investigación. En cada área cerebral analizada se describen las variaciones en la expresión génica de los genes de interés ante la exposición a la ANF. Así también, se muestran las fases conductuales en las que podrían estar involucrados los cambios en la dinámica de expresión.



Creado con BioRender.com

Figura.20. Principales resultados obtenidos sobre la expresión de los genes de interés en las tres áreas cerebrales de estudiadas: hipocampo, núcleo accumbens y estriado dorsal. Se muestra la relación de estos cambios en la dinámica de expresión génica con las fases conductuales estudiadas.

8 Conclusiones

De acuerdo con lo discutido anteriormente, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La asociación entre los efectos recompensantes experimentados ante exposiciones repetidas e intermitentes a la anfetamina y las claves contextuales en la arena del campo abierto induce el desarrollo e incubación de la sensibilización de la actividad locomotora anticipatoria condicionada.
- La exposición a inyecciones repetidas e intermitentes de anfetamina induce el desarrollo de la sensibilización conductual reflejada como un aumento progresivo de la locomoción de los animales en los 45 minutos de campo abierto posterior a la inyección del psicoestimulante a lo largo de los días.
- El protocolo de administración repetida e intermitente de anfetamina (2.5mg/Kg i.p) con 30 días de retirada de la droga no induce la incubación de la sensibilización conductual esperada para los animales del grupo ANF-SAL y ANF-ANF.
- Las inyecciones repetidas de solución salina en el grupo SAL-ANF podría ser un estímulo estresante que genera procesos de sensibilización cruzada.
- Los cambios en el perfil de expresión en el hipocampo responden principalmente a la exposición aguda de los animales a la anfetamina reflejándose en cambios transitorios en la expresión de TrkB, Cfl1 y Arp2. Estos cambios en la expresión génica podrían estar acompañando el inicio y consolidación de los procesos de aprendizaje asociativo entre los estímulos recompensantes de la droga y el contexto donde es administrada.
- La participación del núcleo accumbens en la fase de desarrollo de la sensibilidad conductual va de la mano con un aumento en la expresión de TrkB y BDNF, lo que podría así también potenciar la vía de señalización intracelular relacionada y explicar el cambio en la expresión de genes que codifican para proteínas de unión a la actina como Arp2 y Clf1.
- Algunos de los genes evaluados en el estriado dorsal como CREB, p250GAP y Arp2 son marcadores sensibles, pero no específicos del desarrollo o incubación de la sensibilización de la actividad anticipatoria condicionada o del desarrollo de la sensibilización conductual.
- Hasta el momento no hay trabajos publicados que estudien el efecto de la anfetamina en los niveles de TrkB, BDNF, CREB, p250GAP, Cfl1 y Arp2 en conjunto, durante

el desarrollo e incubación de la sensibilización conductual. Algunos de nuestros resultados difieren con lo descrito en la literatura, lo que podría deberse a diferencias entre los diseños experimentales.

9 Recomendaciones

Tomando en consideración la experiencia de la realización de este trabajo de investigación se incluyen una serie de recomendaciones para investigaciones futuras en el tema:

- Al estudiar la actividad locomotora anticipatoria condicionada se recomienda que el emparejamiento entre el estímulo recompensante de la sustancia de abuso y la arena del campo abierto sea inmediato y no con 15 minutos de anticipación. Esto puesto que se propone que la diferencia en la adquisición del condicionamiento observada se debe a que en otros protocolos como el de condicionamiento de preferencia de lugar el emparejamiento se realiza de manera inmediata.
- Realizar variaciones en el protocolo experimental de tal forma que posterior al periodo de retirada se evidencie la incubación de la sensibilización conductual. Estos cambios podrían incluir mayor número de exposiciones a la droga y menos días de retirada.
- Incluir un grupo de animales a los cuáles se les evalúe la locomoción y la expresión génica, sin embargo, no se expongan a inyecciones ni de salina ni de anfetamina durante el protocolo experimental, de tal forma que puedan obtenerse conclusiones más robustas sobre la sensibilización cruzada producto de estímulos estresantes.
- Analizar otras conductas motoras en los sujetos experimentales, como por ejemplo el rearing y el grooming. De esta forma, se podría identificar si éstas se sensibilizan ante la exposición repetida a anfetamina, aportando más información sobre la conducta de los animales como predictor de eventos como las recaídas.
- Analizar la expresión génica de mayor cantidad de genes participantes de la vía de señalización propuesta, como por ejemplo del mir-132. Así como también de otras moléculas reguladoras que se cree podrían estar involucradas en la regulación de la expresión génica de las proteínas en estudio como, por ejemplo, receptores de glutamato.

- Utilizar otras técnicas moleculares que permitan obtener información sobre los productos funcionales que codifican los genes en estudio. Por ejemplo, los niveles proteicos de estos o su estado de fosforilación.
- Emplear técnicas que permitan la evaluación de la plasticidad estructural en las diferentes áreas de estudio, de tal forma que pueda realizarse una correlación entre los cambios observados en la expresión génica de los genes de interés y su participación en la plasticidad estructural. Se podrían utilizar tinciones neuronales como el protocolo de Golgi-Cox o la utilización de tinciones intracelulares fluorescentes, siendo estas las opciones de menor costo.
- Incluir en la investigación otras áreas cerebrales que formen parte del sistema mesocorticolímbico con funciones descritas en la literatura en el desarrollo e incubación de la sensibilización conductual. Una de ellas puede ser el área tegmental ventral.

10 Referencias

- Alsina, B., Vu, T., & Cohen-Cory, S. (2001). Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1093–1101. <https://doi.org/10.1038/nn735>
- Anagnostaras, S. G., Schallert, T., & Robinson, T. E. (2002). Memory processes governing amphetamine-induced psychomotor sensitization. *Neuropsychopharmacology*, 26(6), 703–715. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00402-X](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00402-X)
- Anthony Altar, C., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J. M., Acheson, A. L., Lindsay, R. M., & Wiegand, S. J. (1997). Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*, 389(6653), 856–860. <https://doi.org/10.1038/39885>
- Badiani, A., Belin, D., Epstein, D., Calu, D., & Shaham, Y. (2011). Opiate versus psychostimulant addiction: the differences do matter. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(11), 685–700. <https://doi.org/10.1038/nrn3104>
- Bahi, A., Boyer, F., & Dreyer, J. L. (2008). Role of accumbens BDNF and TrkB in cocaine-induced psychomotor sensitization, conditioned-place preference, and reinstatement in rats. *Psychopharmacology*, 199(2), 169–182. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1164-1>
- Bamburg, J. R., & Wiggan, O. P. (2002). ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends in Cell Biology*, 12(12), 598–605. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02404-2](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02404-2)
- Barco, A., Patterson, S., Alarcon, J. M., Gromova, P., Mata-Roig, M., Morozov, A., & Kandel, E. R. (2005). Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron*, 48(1), 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.005>
- Barrot, M., Olivier, J. D. A., Perrotti, L. I., DiLeone, R. J., Berton, O., Eisch, A. J., Impey, S., Storm, D. R., Neve, R. L., Yin, J. C., Zachariou, V., & Nestler, E. J. (2002). CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11435–11440. <https://doi.org/10.1073/pnas.172091899>
- Beckstead, M. J., Gantz, S. C., Ford, C. P., Stenzel-Poore, M. P., Phillips, P. E. M., Mark, G. P., & Williams, J. T. (2009). CRF enhancement of GIRK channel-mediated transmission in dopamine neurons. *Neuropsychopharmacology*, 34(8), 1926–1935. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.25>
- Benito, E., & Barco, A. (2010). CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends in Neurosciences*, 33(5), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.02.001>

- Bernstein, B. W., & Bamburg, J. R. (2010). ADF/Cofilin: A functional node in cell biology. *Trends in Cell Biology*, 20(4), 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.01.001>
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews*, 28(3), 309–369. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(98\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00019-8)
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (2016). *Liking, Wanting, and the Incentive-Sensitization Theory of Addiction*. 71(8), 670–679.
- Boileau, I., Dagher, A., Leyton, M., Gunn, R. N., Baker, G. B., Diksic, M., & Benkelfat, C. (2006). Modeling Sensitization to Stimulants in Humans. *Archives of General Psychiatry*, 63(12). <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.12.1386>
- Bonci, A., & Williams, J. T. (1996). A common mechanism mediates long-term changes in synaptic transmission after chronic cocaine and morphine. *Neuron*, 16(3), 631–639. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80082-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80082-3)
- Borovac, J., Bosch, M., & Okamoto, K. (2018). Regulation of actin dynamics during structural plasticity of dendritic spines: Signaling messengers and actin-binding proteins. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 91(July), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.07.001>
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, 82(2), 444–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>
- Bowers, M. S., Chen, B. T., & Bonci, A. (2010). AMPA receptor synaptic plasticity induced by psychostimulants: the past, present, and therapeutic future. In *Neuron* (Vol. 67, Issue 1, pp. 11–24). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.004>
- Brabant, C., Quertemont, E., & Tirelli, E. (2005). Influence of the dose and the number of drug-context pairings on the magnitude and the long-lasting retention of cocaine-induced conditioned place preference in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology*, 180(1), 33–40. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2138-6>
- Bramham, C. R., & Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. *Progress in Neurobiology*, 76(2), 99–125. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.003>
- Brenes, J. C., Padilla, M., & Fornaguera, J. (2009). A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behavioural Brain Research*, 197(1), 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.08.014>
- Briand, L. A., & Blendy, J. A. (2010). Molecular and genetic substrates linking stress and addiction. *Brain Research*, 1314, 219–234. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.11.002>

- Brightwell, J. J., Gallagher, M., & Colombo, P. J. (2004). Hippocampal CREB1 but not CREB2 is decreased in aged rats with spatial memory impairments. *Neurobiology of Learning and Memory*, *81*(1), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2003.08.001>
- Burke, A. R., & Miczek, K. A. (2014). Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: Role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology*, *231*(8), 1557–1580. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3369-1>
- Cador, M., Bjijou, Y., & Stinus, L. (1995). *EVIDENCE OF A COMPLETE INDEPENDENCE OF THE NEUROBIOLOGICAL SUBSTRATES FOR THE INDUCTION AND EXPRESSION OF BEHAVIORAL SENSITIZATION TO AMPHETAMINE* (Vol. 65, Issue 94).
- Calipari, E. S., Sun, H., Eldeeb, K., Luessen, D. J., Feng, X., Howlett, A. C., Jones, S. R., & Chen, R. (2014). Amphetamine self-administration attenuates dopamine D2 autoreceptor function. *Neuropsychopharmacology*, *39*(8), 1833–1842. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.30>
- Carlezon, W. A., Duman, R. S., & Nestler, E. J. (2005). The many faces of CREB. *Trends in Neurosciences*, *28*(8), 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.06.005>
- Carlezon, W. A., & Nestler, E. J. (2002). Elevated levels of GluR1 in the midbrain: A trigger for sensitization to drugs of abuse? In *Trends in Neurosciences* (Vol. 25, Issue 12, pp. 610–615). [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02289-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02289-0)
- Carlezon, W. A., Thome, J., Olson, V. G., Lane-Ladd, S. B., Brodtkin, E. S., Hiroi, N., Duman, R. S., Neve, R. L., & Nestler, E. J. (1998). Regulation of cocaine reward by CREB. *Science*, *282*(5397), 2272–2275. <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2272>
- Carlier, A. M., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Xia, G., Hong, Y., Chua, N., Pantaloni, D., Laurent, V., Santolini, J., & Didry, D. (1997). Factor (ADF / Cofilin) Enhances the Rate of Actin Depolymerizing Filament Turnover : Motility Implication in Actin-based. *The Journal of Cell Biology*, *136*(6), 1307–1322. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.6.1307>
- Carmack, S. A., Koob, G. F., & Anagnostaras, S. G. (2017). Learning and Memory in Addiction. In *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (pp. 523–538). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21101-2>
- Carmichael, O., & Lockhart, S. (2012). The Role of Diffusion Tensor Imaging in the Study of Cognitive Aging. *Curr Topics Behav Neurosci*, *11*, 289–320. <https://doi.org/10.1007/7854>
- Carter, B. D., Zirrgiebel, U., & Barde, Y. A. (1995). Differential regulation of p21ras activation in neurons by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(37), 21751–21757. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.37.21751>
- Cepeda, C., & Levine, M. S. (1998). Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the Neostriatum. *Developmental Neuroscience*, *20*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1159/000017294>

- Chan, C., Beltzner, C. C., & Pollard, T. D. (2009). Cofilin Dissociates Arp2/3 Complex and Branches from Actin Filaments. *Current Biology*, *19*(7), 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.060>
- Cho, A. K., Melega, W. P., Kuczenski, R., Segal, D. S., & Schmitz, D. A. (1999). Caudate-putamen dopamine and stereotypy response profiles after intravenous and subcutaneous amphetamine. *Synapse*, *31*(2), 125–133. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199902\)31:2<125::AID-SYN5>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199902)31:2<125::AID-SYN5>3.0.CO;2-W)
- Choi, F. Y., Ahn, S., Wang, Y. T., & Phillips, A. G. (2014). Interference with AMPA receptor endocytosis: Effects on behavioural and neurochemical correlates of amphetamine sensitization in male rats. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, *39*(3), 189–199. <https://doi.org/10.1503/jpn.120257>
- Choi, K. H., Whisler, K., Graham, D. L., & Self, D. W. (2006). Antisense-induced reduction in nucleus accumbens cyclic AMP response element binding protein attenuates cocaine reinforcement. *Neuroscience*, *137*(2), 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.049>
- Corominas, M., Roncero, C., Ribases, M., Castells, X., & Casas, M. (2007). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Intracellular Signaling Pathways in Cocaine Addiction. *Neuropsychobiology*, *55*(1), 2–13. <https://doi.org/10.1159/000103570>
- Crombag, H. S. (2004). Opposite Effects of Amphetamine Self-administration Experience on Dendritic Spines in the Medial and Orbital Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, *15*(3), 341–348. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh136>
- Crombag, H. S., Bossert, J. M., Koya, E., & Shaham, Y. (2008). Context-induced relapse to drug seeking: A review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *363*(1507), 3233–3243. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0090>
- Crombag, H. S., & Shaham, Y. (2002). Renewal of drug seeking by contextual cues after prolonged extinction in rats. *Behavioral Neuroscience*, *116*(1), 169–173. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.116.1.169>
- Crooks, K. R., Kleven, D. T., Rodriguiz, R. M., Wetsel, W. C., & McNamara, J. O. (2010). TrkB signaling is required for behavioral sensitization and conditioned place preference induced by a single injection of cocaine. *Neuropharmacology*, *58*(7), 1067–1077. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.01.014>
- Cruz, F. C., Marin, M. T., Leão, R. M., & Planeta, C. S. (2012). Stress-induced cross-sensitization to amphetamine is related to changes in the dopaminergic system. *Journal of Neural Transmission*, *119*(4), 415–424. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0720-8>

- Cunha. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 3(1), 1–14. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.001.2010>
- Dash, P. K., Hochner, B., & Kandel, E. R. (1990). Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature*, 345(6277), 718–721. <https://doi.org/10.1038/345718a0>
- Day, J. J., Roitman, M. F., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2007). Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, 10(8), 1020–1028. <https://doi.org/10.1038/nn1923>
- Di Chiara, G. (1998). A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *Journal of Psychopharmacology*, 12(1), 54–67. <https://doi.org/10.1177/026988119801200108>
- Dietz, D. M., Sun, H., Lobo, M. K., Cahill, M. E., Chadwick, B., Gao, V., Koo, J. W., Mazei-Robison, M. S., Dias, C., Maze, I., Damez-Werno, D., Dietz, K. C., Scobie, K. N., Ferguson, D., Christoffel, D., Ohnishi, Y., Hodes, G. E., Zheng, Y., Neve, R. L., ... Nestler, E. J. (2012). Essential Role for Rac1 in Cocaine-Induced Structural Plasticity of Nucleus Accumbens Neurons. *Nature Neuroscience*, 15(6), 891–896. <https://doi.org/10.1038/nn.3094>
- Dijkhuizen, P. A., & Ghosh, A. (2005). Regulation of dendritic growth by calcium and neurotrophin signaling. In *Progress in Brain Research* (Vol. 147, pp. 15–27). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(04\)47002-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(04)47002-2)
- Dipace, C., Sung, U., Binda, F., Blakely, R. D., & Galli, A. (2006). Amphetamine Induces a Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Dependent Reduction in Norepinephrine Transporter Surface Expression Linked to Changes in Syntaxin 1A/Transporter Complexes. *Molecular Pharmacology*, 71(1), 230–239. <https://doi.org/10.1124/mol.106.026690>
- Dosremedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., & Nosworthy, N. J. (2003). Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*, 83(2), 433–473. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2002>
- Drake, C. T., Milner, T. A., & Patterson, S. L. (1999). Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 19(18), 8009–8026. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-18-08009.1999>
- Eichenbaum, H. (2017). The role of the hippocampus in navigation is memory. *Journal of Neurophysiology*, 117(4), 1785–1796. <https://doi.org/10.1152/jn.00005.2017>
- Elsworth, J. D., & Roth, R. H. (2009). Dopamine. *Encyclopedia of Neuroscience*, 539–547. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00683-5>

- Engelke, D. S., Filev, R., Mello, L. E., & Santos-Junior, J. G. (2017). Evidence of memory generalization in contextual locomotor sensitization induced by amphetamine. *Behavioural Brain Research*, *317*, 522–527. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.018>
- Esparza, M. A., Bollati, F., Garcia-Keller, C., Virgolini, M. B., Lopez, L. M., Brusco, A., Shen, H. W., Kalivas, P. W., & Cancela, L. M. (2012). Stress-induced sensitization to cocaine: Actin cytoskeleton remodeling within mesocorticolimbic nuclei. *European Journal of Neuroscience*, *36*(8), 3103–3117. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08239.x>
- Fasano, S., Pittenger, C., & Brambilla, R. (2009). Inhibition of CREB activity in the dorsal portion of the striatum potentiates behavioral responses to drugs of abuse. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *3*(SEP), 29. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.029.2009>
- Featherby, T., Van Den Buuse, M., Lubman, D. I., & Lawrence, A. J. (2008). Persistent downregulation of hippocampal CREB mRNA parallels a Y-maze deficit in adolescent rats following semi-chronic amphetamine administration. *British Journal of Pharmacology*, *154*(2), 417–428. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.126>
- Fernández-Espejo, E. (2006). Neurobiología de la adicción a psicoestimulantes. *Revista de Neurología*, *43*(3), 147–154.
- Ferraguti, F., & Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell and Tissue Research*, *326*(2), 483–504. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0266-5>
- Ferrario, C. R., Gorny, G., Crombag, H. S., Li, Y., Kolb, B., & Robinson, T. E. (2005a). Neural and behavioral plasticity associated with the transition from controlled to escalated cocaine use. *Biological Psychiatry*, *58*(9), 751–759. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.04.046>
- Ferrario, C. R., Gorny, G., Crombag, H. S., Li, Y., Kolb, B., & Robinson, T. E. (2005b). Neural and Behavioral Plasticity Associated with the Transition from Controlled to Escalated Cocaine Use. *Biological Psychiatry*, *58*(9), 751–759. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.04.046>
- Filip, M., Faron-Górecka, A., Kuśmider, M., Gołda, A., Frankowska, M., & Dziejzicka-Wasylewska, M. (2006a). Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. *Brain Research*, *1071*(1), 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.099>
- Filip, M., Faron-Górecka, A., Kuśmider, M., Gołda, A., Frankowska, M., & Dziejzicka-Wasylewska, M. (2006b). Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. *Brain Research*, *1071*(1), 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.099>
- Fitzgerald, L. W., Ortiz, J., Hamedani, A. G., & Nestler, E. J. (1996). Drugs of abuse and stress increase the expression of GluRI and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral

- tegmental area: Common adaptations among cross-sensitizing agents. *Journal of Neuroscience*, *16*(1), 274–282. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-01-00274.1996>
- Fleckenstein, A. E., Volz, T. J., Riddle, E. L., Gibb, J. W., & Hanson, G. R. (2007). New Insights into the Mechanism of Action of Amphetamines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *47*(1), 681–698. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105140>
- Frank, L. (1996). BDNF down-regulates neurotrophin responsiveness, TrkB protein and TrkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, *8*(6), 1220–1230. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01290.x>
- Gardner, E. L. (2005). Endocannabinoid signaling system and brain reward: Emphasis on dopamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *81*(2), 263–284. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.01.032>
- Gass, J. T., & Olive, M. F. (2008). Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochemical Pharmacology*, *75*(1), 218–265. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.039>
- Giorgetti, M., Hotsenpiller, G., Ward, P., Teppen, T., & Wolf, M. E. (2001). Amphetamine-induced plasticity of AMPA receptors in the ventral tegmental area: Effects on extracellular levels of dopamine and glutamate in freely moving rats. *Journal of Neuroscience*, *21*(16), 6362–6369. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-06362.2001>
- Goeders, N. B., & Guerin, G. F. (1996). Effects of surgical and pharmacological adrenalectomy on the initiation and maintenance of intravenous cocaine self-administration in rats. *Brain Research*, *722*(1–2), 145–152. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00206-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00206-5)
- Golden, S. A., & Russo, S. J. (2012). Mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(10), 1–24. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011957>
- Grace, A. A. (1995). The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function. *Drug and Alcohol Dependence*, *37*(2), 111–129. [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(94\)01066-T](https://doi.org/10.1016/0376-8716(94)01066-T)
- Graham, D. L., Edwards, S., Bachtell, R. K., DiLeone, R. J., Rios, M., & Self, D. W. (2007). Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nature Neuroscience*, *10*(8), 1029–1037. <https://doi.org/10.1038/nn1929>
- Graham, D. L., Krishnan, V., Larson, E. B., Graham, A., Edwards, S., Bachtell, R. K., Simmons, D., Gent, L. M., Berton, O., Bolanos, C. A., DiLeone, R. J., Parada, L. F., Nestler, E. J., & Self, D. W. (2009). Tropomyosin-Related Kinase B in the Mesolimbic Dopamine System: Region-Specific Effects on Cocaine Reward. *Biological Psychiatry*, *65*(8), 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.09.032>

- Grimm, J. W., Hope, B. T., Wise, R. A., & Shaham, Y. (2001). Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature*, *412*(6843), 141–142. <https://doi.org/10.1038/35084134>
- Grimm, Jeffrey W, Lu, L., Hayashi, T., Hope, B. T., Su, T.-P., & Shaham, Y. (2003). Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *The Journal of Neuroscience*, *23*(3), 742–747. [https://doi.org/0270-6474/03/230742-06\\$15.00/0](https://doi.org/0270-6474/03/230742-06$15.00/0)
- Groves, P. M., & Thompson, R. F. (1970). Habituation: A dual-process theory. *Psychological Review*, *77*(5), 419–450. <https://doi.org/10.1037/h0029810>
- Guillin, O., Diaz, J., Carroll, P., Griffon, N., Schwartz, J. C., & Sokoloff, P. (2001). BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature*, *411*(6833), 86–89. <https://doi.org/10.1038/35075076>
- Haber, S. N., & Calzavara, R. (2009). The cortico-basal ganglia integrative network: The role of the thalamus. *Brain Research Bulletin*, *78*(2–3), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.09.013>
- Haile, C. N., GrandPre, T., & Kosten, T. A. (2001). Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress, enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology*, *154*(2), 213–220. <https://doi.org/10.1007/s002130000650>
- Hansen, K. F., Sakamoto, K., Wayman, G. A., Impey, S., & Obrietan, K. (2010). Transgenic miR132 Alters Neuronal Spine Density and Impairs Novel Object Recognition Memory. *PLoS ONE*, *5*(11), e15497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015497>
- Hansen, R. T., & Zhang, H. T. (2013). Senescent-induced dysregulation of cAMP/CREB signaling and correlations with cognitive decline. *Brain Research*, *1516*, 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.033>
- Hinson, R. E., & Poulos, C. X. (1981). Sensitization to the behavioral effects of cocaine: Modification by Pavlovian conditioning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *15*(4), 559–562. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(81\)90208-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(81)90208-2)
- Hollander, J. A., Im, H. I., Amelio, A. L., Kocerha, J., Bali, P., Lu, Q., Willoughby, D., Wahlestedt, C., Conkright, M. D., & Kenny, P. J. (2010). Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature*, *466*(7303), 197–202. <https://doi.org/10.1038/nature09202>
- Horger, B. A., Iyasere, C. A., Berhow, M. T., Messer, C. J., Nestler, E. J., & Taylor, J. R. (1999). Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(10), 4110–4122. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10234039>
- Hu, B., Nikolakopoulou, A. M., & Cohen-Cory, S. (2005). BDNF stabilizes synapses and maintains

- the structural complexity of optic axons in vivo. *Development (Cambridge, England)*, 132(19), 4285–4298. <https://doi.org/10.1242/dev.02017>
- Huang, C.-C., Yeh, C.-M., Wu, M.-Y., Chang, A. Y. W., Chan, J. Y. H., Chan, S. H. H., & Hsu, K.-S. (2011). Cocaine Withdrawal Impairs Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Long-Term Depression in the Nucleus Accumbens. *Journal of Neuroscience*, 31(11), 4194–4203. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5239-10.2011>
- Huang, Y. H., Lin, Y., Mu, P., Lee, B. R., Brown, T. E., Wayman, G., Marie, H., Liu, W., Yan, Z., Sorg, B. A., Schlüter, O. M., Zukin, R. S., & Dong, Y. (2009). In vivo cocaine experience generates silent synapses. *Neuron*, 63(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.007>
- Huston, J. P., Silva, M. A. D. S., Topic, B., & Müller, C. P. (2013). What's conditioned in conditioned place preference? *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(3), 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.01.004>
- Hyman, S. E., & Malenka, R. C. (2001). Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10), 695–703. <https://doi.org/10.1038/35094560>
- Hyman, S. E., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2006). NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 565–598. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009>
- Im, H.-I., & Kenny, P. J. (2012). MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends in Neurosciences*, 35(5), 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.004>
- Impey, S., Davare, M., Lasiek, A., Fortin, D., Ando, H., Varlamova, O., Obrietan, K., Soderling, T. R., Goodman, R. H., & Wayman, G. A. (2010). An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 43(1), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.10.005>
- Iwakura, Y., Nawa, H., Sora, I., & Chao, M. V. (2008). Dopamine D1 receptor-induced signaling through TrkB receptors in striatal neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15799–15806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801553200>
- Izquierdo, L. A., Viola, H., Barros, D. M., Alonso, M., Vianna, M. R. M., Furman, M., Levi De Stein, M., Szapiro, G., Rodrigues, C., Choi, H., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2001). Novelty enhances retrieval: Molecular mechanisms involved in rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 13(7), 1464–1467. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01530.x>
- Jedynak, J. P., Uslander, J. M., Esteban, J. A., & Robinson, T. E. (2007). Methamphetamine-induced structural plasticity in the dorsal striatum. *European Journal of Neuroscience*, 25(3), 847–853. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05316.x>

- Ji, Y., Pang, P. T., Feng, L., & Lu, B. (2005). Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nature Neuroscience*, 8(2), 164–172. <https://doi.org/10.1038/nn1381>
- Jin, X., Hu, H., Mathers, P. H., & Agmon, A. (2003). Brain-derived neurotrophic factor mediates activity-dependent dendritic growth in nonpyramidal neocortical interneurons in developing organotypic cultures. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(13), 5662–5673. <https://doi.org/23/13/5662> [pii]
- Johannessen, M., Delghandi, M. P., & Moens, U. (2004). What turns CREB on? *Cellular Signalling*, 16(11), 1211–1227. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.05.001>
- Kahlig, K. M., Binda, F., Khoshbouei, H., Blakely, R. D., McMahon, D. G., Javitch, J. A., & Galli, A. (2005). Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9), 3495–3500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407737102>
- Kalivas, P. W., Sorg, B. A., & Hooks, M. S. (1993). The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behavioural Pharmacology*, 4(4), 315–334. <https://doi.org/10.1097/00008877-199308000-00005>
- Kalivas, Peter W., & Duffy, P. (2002). Repeated Cocaine Administration Alters Extracellular Glutamate in the Ventral Tegmental Area. *Journal of Neurochemistry*, 70(4), 1497–1502. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70041497.x>
- Kelly, M. A., Low, M. J., Rubinstein, M., & Phillips, T. J. (2008). Role of dopamine D1-like receptors in methamphetamine locomotor responses of D2 receptor knockout mice. *Genes, Brain and Behavior*, 7(5), 568–577. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00392.x>
- Kim, I. H., Racz, B., Wang, H., Burianek, L., Weinberg, R., Yasuda, R., Wetsel, W. C., & Soderling, S. H. (2013). Disruption of Arp2/3 Results in Asymmetric Structural Plasticity of Dendritic Spines and Progressive Synaptic and Behavioral Abnormalities. *Journal of Neuroscience*, 33(14), 6081–6092. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0035-13.2013>
- Klawonn, A. M., & Malenka, R. C. (2018). Nucleus accumbens modulation in reward and aversion. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 83, 119–129. <https://doi.org/10.1101/sqb.2018.83.037457>
- Köks, S. (2015). Experimental models on effects of psychostimulants. *International Review of Neurobiology*, 120, 107–129. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.03.002>
- Kolb, B., Gorny, G., Li, Y., Samaha, A.-N., & Robinson, T. E. (2003). Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10523–10528.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.18342711100>
- Konradi, C., & Cole, R. (1994). Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. *The Journal of Neuroscience*, *14*(9), 5623–5634. <http://www.jneurosci.org/content/14/9/5623.short>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 217–238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., & Moryś, J. (2018). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *38*(3), 579–593. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>
- Kuczewski, N., Porcher, C., Lessmann, V., Medina, I., & Gaiarsa, J. L. (2009). Activity-dependent dendritic release of BDNF and biological consequences. *Molecular Neurobiology*, *39*(1), 37–49. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8050-7>
- Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2016). Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction. *Learning & Memory*, *23*(10), 515–533. <https://doi.org/10.1101/lm.042192.116>
- Lai, K. O., & Ip, N. Y. (2013). Structural plasticity of dendritic spines: The underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1832*(12), 2257–2263. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.08.012>
- Langdon, A. J., Sharpe, M. J., Schoenbaum, G., & Niv, Y. (2018). Model-based predictions for dopamine. *Current Opinion in Neurobiology*, *49*(3), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.006>
- Larson, E. B., Graham, D. L., Arzaga, R. R., Buzin, N., Webb, J., Green, T. A., Bass, C. E., Neve, R. L., Terwilliger, E. F., Nestler, E. J., & Self, D. W. (2011). Overexpression of CREB in the Nucleus Accumbens Shell Increases Cocaine Reinforcement in Self-Administering Rats. *Journal of Neuroscience*, *31*(45), 16447–16457. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3070-11.2011>
- Lee, D. K., Bian, S., Rahman, M. A., Shim, Y. B., Shim, I., & Choe, E. S. (2008). Repeated cocaine administration increases N-methyl-d-aspartate NR1 subunit, extracellular signal-regulated kinase and cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and glutamate release in the rat dorsal striatum. *European Journal of Pharmacology*, *590*(1–3), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.048>
- Leyton, M. (2007). Conditioned and sensitized responses to stimulant drugs in humans. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *31*(8), 1601–1613. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.08.027>

- Li, X., & Wolf, M. E. (2015). Multiple faces of BDNF in cocaine addiction. *Behavioural Brain Research*, 279(1), 240–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.11.018>
- Li, Y., Acerbo, M. J., & Robinson, T. E. (2004). The induction of behavioural sensitization is associated with cocaine-induced structural plasticity in the core (but not shell) of the nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 20(6), 1647–1654. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03612.x>
- Liu, X., Liu, W., Jin, Y., Yu, W., Wang, F., & Liu, L. (2010). Effect of gestational and lactational exposure to perfluorooctanesulfonate on calcium-dependent signaling molecules gene expression in rats' hippocampus. *Archives of Toxicology*, 84(1), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0467-2>
- Lobo, M. K., & Nestler, E. J. (2011). The striatal balancing act in drug addiction: Distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5(JULY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00041>
- Lodge, D. J., & Grace, A. A. (2008). Amphetamine activation of hippocampal drive of mesolimbic dopamine neurons: A mechanism of behavioral sensitization. *Journal of Neuroscience*, 28(31), 7876–7882. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1582-08.2008>
- Loubon, C. O., & Franco, J. C. (2010). Neurofisiología del aprendizaje y la memoria. Plasticidad neuronal. *Archivos de Medicina*, 6(1). <https://doi.org/10.3823/048>
- Lynch, W. J., Nicholson, K. L., Dance, M. E., Morgan, R. W., & Foley, P. L. (2010). Animal models of substance abuse and addiction: Implications for science, animal welfare, and society. *Comparative Medicine*, 60(3), 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.06.022>
- Madrigal, S., & Chacón, W. (2012). *Consumo de Cocaína y Crack*.
- Marin, M. T., Berkow, A., Golden, S. A., Koya, E., Planeta, C. S., & Hope, B. T. (2009). Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in the rat nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 30(10), 1931–1940. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06982.x>
- Mattson, B. J., Koya, E., Simmons, D. E., Mitchell, T. B., Berkow, A., Crombag, H. S., & Hope, B. T. (2008). Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 27(1), 202–212. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05984.x>
- Mattson, M. P., Maudsley, S., & Martin, B. (2004). BDNF and 5-HT: A dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences*, 27(10), 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.08.001>
- May, A. (2011). Experience-dependent structural plasticity in the adult human brain. *Trends in*

- Cognitive Sciences*, 15(10), 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.08.002>
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(8), 599–609. <https://doi.org/10.1038/35085068>
- McEwen, B. S., Eiland, L., Hunter, R. G., & Miller, M. M. (2012). Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology*, 62(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.014>
- McGinty, J. F., Whitfield, T. W., & Berglind, W. J. (2010). Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain Research*, 1314, 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.078>
- Melega, W. P., Williams, A. E., Schmitz, D. A., DiStefano, E. W., & Cho, A. K. (1995). Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of the actions of D- amphetamine and D-methamphetamine on the dopamine terminal. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 274(1), 90–96.
- Miller, E. K., & Cohen, J. D. (2001). An integrate theory of PFC function. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
- Miranda, F., Cedillo-Ildefonso, B., Jiménez, J. C., Bedolla Nuñez, G., & Torres Rodriguez, S. (2011). Substitución asimétrica entre metanfetamina y anfetamina: Estudio de discriminación de drogas. *Revista Mexicana de Análisis de La Conducta*, 37(1). <https://doi.org/10.5514/rmac.v37.i1.24685>
- Miserendino, M. J. D., & Nestler, E. J. (1995). Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. *Brain Research*, 674(2), 299–306. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00030-T](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00030-T)
- Moncada, D., & Viola, H. (2006). Phosphorylation state of CREB in the rat hippocampus: A molecular switch between spatial novelty and spatial familiarity? *Neurobiology of Learning and Memory*, 86(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.12.002>
- Moriyama, K., Iida, K., & Yahara, I. (1996). Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes to Cells*, 1(1), 73–86. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.05005.x>
- Moses, S. N., Sutherland, R. J., & McDonald, R. J. (2002). Differential involvement of amygdala and hippocampus in responding to novel objects and contexts. *Brain Research Bulletin*, 58(5), 517–527. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(02\)00820-1](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(02)00820-1)
- Nakazawa, T., Kuriu, T., Tezuka, T., Umemori, H., Okabe, S., & Yamamoto, T. (2008). Regulation of dendritic spine morphology by an NMDA receptor-associated Rho GTPase-activating

- protein, p250GAP. *Journal of Neurochemistry*, 105(4), 1384–1393. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05335.x>
- Nibuya, M., Morinobu, S., & Durman, R. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in Rat Brain by Chronic Electroconvulsive Seizure and Antidepressant Drug Treatments. *The Journal of Neuroscience*, 15(11), 7539–7547.
- Nikulina, E. M., Covington, H. E., Ganschow, L., Hammer, R. P., & Miczek, K. A. (2004). Long-term behavioral and neuronal cross-sensitization to amphetamine induced by repeated brief social defeat stress: Fos in the ventral tegmental area and amygdala. *Neuroscience*, 123(4), 857–865. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.10.029>
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., & Uemura, T. (2002). Control of actin reorganization by slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell*, 108(2), 233–246. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00638-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00638-9)
- Nordquist, R. E., Vanderschuren, L. J. M. J., Jonker, A. J., Bergsma, M., De Vries, T. J., Pennartz, C. M. A., & Voorn, P. (2008). Expression of amphetamine sensitization is associated with recruitment of a reactive neuronal population in the nucleus accumbens core. *Psychopharmacology*, 198(1), 113–126. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1100-4>
- O'BRIEN, C. P., CHILDRESS, A. R., McLELLAN, A. T., & EHRMAN, R. (1992). Classical Conditioning in Drug-Dependent Humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 654(1), 400–415. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb25984.x>
- O'Brien, C. P., & Gardner, E. L. (2005). Critical assessment of how to study addiction and its treatment: Human and non-human animal models. *Pharmacology & Therapeutics*, 108(1), 18–58. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.06.018>
- Ostlund, S. B., Leblanc, K. H., Kosheleff, A. R., Wassum, K. M., & Maidment, N. T. (2014). Phasic mesolimbic dopamine signaling encodes the facilitation of incentive motivation produced by repeated cocaine exposure. *Neuropsychopharmacology*, 39(10), 2441–2449. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.96>
- Overton, P. G., & Clark, D. (1997). Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Research Reviews*, 25(3), 312–334. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00039-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00039-8)
- Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and Memory Functions of the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25(1), 563–593. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937>
- Paladini, C. A., Fiorillo, C. D., Morikawa, H., & Williams, J. T. (2001). Amphetamine selectively blocks inhibitory glutamate transmission in dopamine neurons. *Nature Publishing Group*, 4(3), 275–281.

- Panlilio, L. V., & Goldberg, S. R. (2009). NIH Public Access. *Neuroscience Research*, 102(12), 1863–1870. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2007.02011.x>. Self-administration
- Paulson, P. E., Camp, D. M., & Robinson, T. E. (1991). Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology*, 103(4), 480–492. <https://doi.org/10.1007/BF02244248>
- Paulson, P. E., & Robinson, T. E. (1995). Amphetamine-Induced time-dependent sensitization of dopamine neurotransmission in the dorsal and ventral striatum: A microdialysis study in behaving rats. *Synapse*, 19(1), 56–65. <https://doi.org/10.1002/syn.890190108>
- Perugini, M., & Vezina, P. (1994). *Amphetamine Administered to the Ventral Tegmental Area Sensitizes Rats to the Locomotor Effects of Nucleus Accumbens Amphetamine1* (Vol. 270, Issue 2).
- Phillips, T. J., Kamens, H. M., & Wheeler, J. M. (2008). Behavioral genetic contributions to the study of addiction-related amphetamine effects. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(4), 707–759. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.10.008>
- Phillips, T. J., Pastor, R., Scibelli, A. C., Reed, C., & Tarragón, E. (2011). Animal Models of Behavioral Analysis. In J. Raber (Ed.), *Animal Models of Behavioral Analysis, Neuromethods* (Vol. 50, Issue September 2010). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-883-6>
- Piazza, P. V., & Deroche-Gamonet, V. (2013). A multistep general theory of transition to addiction. *Psychopharmacology*, 229(3), 387–413. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3224-4>
- Pierce, R. C., & Kalivas, P. W. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews*, 25(2), 192–216. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00021-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00021-0)
- Poon, C. S., & Young, D. L. (2006). Nonassociative learning as gated neural integrator and differentiator in stimulus-response pathways. *Behavioral and Brain Functions*, 2, 1–21. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-2-29>
- Pryor, K. O., & Storer, K. P. (2013). Drugs for Neuropsychiatric Disorders. In *Pharmacology and Physiology for Anesthesia* (pp. 180–207). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1679-5.00011-9>
- Pulipparacharuvil, S., Renthal, W., Hale, C. F., Taniguchi, M., Xiao, G., Kumar, A., Russo, S. J., Sikder, D., Dewey, C. M., Davis, M. M., Greengard, P., Nairn, A. C., Nestler, E. J., & Cowan, C. W. (2008). Cocaine Regulates MEF2 to Control Synaptic and Behavioral Plasticity. *Neuron*, 59(4), 621–633. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.020>
- Rademacher, D. J., Kovacs, B., Shen, F., Napier, T. C., & Meredith, G. E. (2006). The neural

- substrates of amphetamine conditioned place preference: Implications for the formation of conditioned stimulus-reward associations. *European Journal of Neuroscience*, 24(7), 2089–2097. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05066.x>
- Rage, F., Silhol, M., Binamé, F., Arancibia, S., & Tapia-Arancibia, L. (2007). Effect of aging on the expression of BDNF and TrkB isoforms in rat pituitary. *Neurobiology of Aging*, 28(7), 1088–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.013>
- Raudensky, J., & Yamamoto, B. K. (2007). Effects of chronic unpredictable stress and methamphetamine on hippocampal glutamate function. *Brain Research*, 1135(1), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.12.002>
- Roberts, A. J., & Koob, G. F. (1997). The Neurobiology of Addiction. *Alcohol Health & Research World*, 21(2), 101–106.
- Roberts, D. C. S., Morgan, D., & Liu, Y. (2007). How to make a rat addicted to cocaine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 31(8), 1614–1624. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.08.028>
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2008). The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1507), 3137–3146. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0093>
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2001). Mechanisms of Action of Addictive Stimuli Incentive-sensitization and addiction. *Addiction Abingdon England*, 96(1), 103–114. <https://doi.org/10.1080/09652140020016996>
- Robinson, T. E., & Kolb, B. (1997). Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(21), 8491–8497. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9334421
- Robinson, Terry E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, 18(3), 247–291. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90013-P](https://doi.org/10.1016/0165-0173(93)90013-P)
- Robinson, Terry E., & Kolb, B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology*, 47(SUPPL. 1), 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.06.025>
- Robison, A. J., & Nestler, E. J. (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(11), 623–637. <https://doi.org/10.1038/nrn3111>
- Robledo, P. (2008). Las anfetaminas. *Trastornos Adictivos*, 10(3), 166–174.

- Rocher, C., & Gardier, A. M. (2001). Effects of repeated systemic administration of d-Fenfluramine on serotonin and glutamate release in rat ventral hippocampus: Comparison with methamphetamine using in vivo microdialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *363*(4), 422–428. <https://doi.org/10.1007/s002100000381>
- Rothman, R. B., Baumann, M. H., Dersch, C. M., Romero, D. V., Rice, K. C., Carroll, F. I., & Partilla, J. S. (2001). Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse*, *39*(1), 32–41. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(20010101\)39:1<32::AID-SYN5>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1098-2396(20010101)39:1<32::AID-SYN5>3.0.CO;2-3)
- Rotty, J. D., Wu, C., & Bear, J. E. (2013). New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(1), 7–12. <https://doi.org/10.1038/nrm3492>
- Russo, S. J., Dietz, D. M., Dumitriu, D., Morrison, J. H., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2010). The addicted synapse: Mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends in Neurosciences*, *33*(6), 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.02.002>
- Saal, D., Dong, Y., Bonci, A., & Malenka, R. C. (2003). Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron*, *37*(4), 577–582. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00021-7)
- Sakai, N., Thome, J., Newton, S. S., Chen, J., Kelz, M. B., Steffen, C., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (2002). Inducible and brain region-specific CREB transgenic mice. *Molecular Pharmacology*, *61*(6), 1453–1464. <https://doi.org/10.1124/mol.61.6.1453>
- Sale, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2014). Environment and Brain Plasticity: Towards an Endogenous Pharmacotherapy. *Physiological Reviews*, *94*(1), 189–234. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2012>
- Sanchez, A. L., Matthews, B. J., Meynard, M. M., Hu, B., Javed, S., Cohen, S., Development, C., Sanchez, A. L., Matthews, B. J., Meynard, M. M., Hu, B., Javed, S., & Cory, S. C. (2006). BDNF increases synapse density in dendrites of developing tectal neurons in vivo. *Development*, *133*(15), 3051–3051. <https://doi.org/10.1242/dev.02518>
- Sanderson, T. M., Hogg, E. L., Collingridge, G. L., & Corrêa, S. A. L. (2016). Hippocampal metabotropic glutamate receptor long-term depression in health and disease: focus on mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 200–214. <https://doi.org/10.1111/jnc.13592>
- Santos, A. R. A., & Duarte, C. B. (2008). Validation of internal control genes for expression studies: Effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, *86*(16), 3684–3692. <https://doi.org/10.1002/jnr.21796>

- Schmidt, K. T., & Weinshenker, D. (2014). Adrenaline Rush: The Role of Adrenergic Receptors in Stimulant-Induced Behaviors. *Molecular Pharmacology*, 85(4), 640–650. <https://doi.org/10.1124/mol.113.090118>
- Schoenbaum, G., Stalnaker, T. A., & Shaham, Y. (2007). A role for BDNF in cocaine reward and relapse. *Nature Neuroscience*, 10(8), 935–936. <https://doi.org/10.1038/nn0807-935>
- Schumann, J., & Yaka, R. (2009). Prolonged Withdrawal from Repeated Noncontingent Cocaine Exposure Increases NMDA Receptor Expression and ERK Activity in the Nucleus Accumbens. *Journal of Neuroscience*, 29(21), 6955–6963. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1329-09.2009>
- Seroogy, K. B., Lundgren, K. H., Tran, T. M. D., Guthrie, K. M., Isackson, P. J., & Gall, C. M. (1994). Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *Journal of Comparative Neurology*, 342(3), 321–334. <https://doi.org/10.1002/cne.903420302>
- Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., De Wit, H., & Stewart, J. (2003). The reinstatement model of drug relapse: History, methodology and major findings. *Psychopharmacology*, 168(1–2), 3–20. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1224-x>
- Shaltiel, G., Hanan, M., Wolf, Y., Barbash, S., Kovalev, E., Shoham, S., & Soreq, H. (2013). Hippocampal microRNA-132 mediates stress-inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target. *Brain Structure and Function*, 218(1), 59–72. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0376-z>
- Shen, F., Meredith, G. E., & Napier, T. C. (2006). Amphetamine-induced place preference and conditioned motor sensitization requires activation of tyrosine kinase receptors in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 26(43), 11041–11051. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2898-06.2006>
- Shen, H. -w., Toda, S., Moussawi, K., Bouknight, A., Zahm, D. S., & Kalivas, P. W. (2009). Altered Dendritic Spine Plasticity in Cocaine-Withdrawn Rats. *Journal of Neuroscience*, 29(9), 2876–2884. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5638-08.2009>
- Singer, B. F., Bubula, N., Przybycien-Szymanska, M. M., Li, D., & Vezina, P. (2016). Stimuli associated with the presence or absence of amphetamine regulate cytoskeletal signaling and behavior. *European Neuropsychopharmacology*, 26(11), 1836–1842. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.09.639>
- Singer, B. F., Tanabe, L. M., Gorny, G., Jake-Matthews, C., Li, Y., Kolb, B., & Vezina, P. (2009). Amphetamine-Induced Changes in Dendritic Morphology in Rat Forebrain Correspond to Associative Drug Conditioning Rather than Nonassociative Drug Sensitization. *Biological*

- Psychiatry*, 65(10), 835–840. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.12.020>
- Sofuoglu, M., & Sewell, R. A. (2009). Norepinephrine and stimulant addiction. *Addiction Biology*, 14(2), 119–129. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2008.00138.x>
- Stahl, S. M. (2013). *Stahl's Essential Psychopharmacology* (Fourth Edi). Cambridge University Press.
- Steketee, J. D., & Kalivas, P. W. (2011). Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 348–365. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001933>
- Steketee, Jeffery D., & Kalivas, P. W. (2011). Drug wanting: Behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 348–365. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001933>
- Sulzer, D., Chen, T.-K., Lau, Y. Y., Kristensen, H., Rayport, S., & Ewing, A. (1995). Amphetamine Redistributes Dopamine from Synaptic the Cytosol and Promotes Reverse Transport Vesicles to. *The Journal of Neuroscience*, 15(May), 4102–4108.
- Swerdlow, N. R., Koob, G. F., Cador, M., Lorang, M., & Hauger, R. L. (1993). Pituitary-adrenal axis responses to acute amphetamine in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 45(3), 629–637. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90518-X](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90518-X)
- Tanabe, L. M., Suto, N., Creekmore, E., Steinmiller, C. L., & Vezina, P. (2004). Blockade of D2 dopamine receptors in the VTA induces a long-lasting enhancement of the locomotor activating effects of amphetamine. *Behavioural Pharmacology*, 15(5–6), 387–395. <https://doi.org/10.1097/00008877-200409000-00013>
- Taniguchi, S., Liu, H., Nakazawa, T., Yokoyama, K., Tezuka, T., & Yamamoto, T. (2003). p250GAP, a neural RhoGAP protein, is associated with and phosphorylated by Fyn. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(1), 151–155. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00923-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00923-9)
- Teixeira-Gomes, A., Costa, V. M., Feio-Azevedo, R., Bastos, M. de L., Carvalho, F., & Capela, J. P. (2015). The neurotoxicity of amphetamines during the adolescent period. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 41, 44–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.12.001>
- Toda, S., Shen, H. W., Peters, J., Cagle, S., & Kalivas, P. W. (2006). Cocaine Increases Actin Cycling: Effects in the Reinstatement Model of Drug Seeking. *Journal of Neuroscience*, 26(5), 1579–1587. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4132-05.2006>
- Trainor, B. C. (2011). Stress responses and the mesolimbic dopamine system: Social contexts and sex differences. *Hormones and Behavior*, 60(5), 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.08.013>

- Tropea, T. F., Kosofsky, B. E., & Rajadhyaksha, A. M. (2008). Enhanced CREB and DARPP-32 phosphorylation in the nucleus accumbens and CREB, ERK, and GluR1 phosphorylation in the dorsal hippocampus is associated with cocaine-conditioned place preference behavior. *Journal of Neurochemistry*, *106*(4), 1780–1790. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05518.x>
- Turgeon, S. M., Pollack, A. E., & Fink, J. S. (1997). Enhanced CREB phosphorylation and changes in c-Fos and FRA expression in striatum accompany amphetamine sensitization. *Brain Research*, *749*(1), 120–126. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01316-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01316-9)
- Tyler, W. J., & Pozzo-Miller, L. (2003). Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *The Journal of Physiology*, *553*(2), 497–509. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.052639>
- Underhill, S. M., Wheeler, D. S., Li, M., Watts, S. D., Ingram, S. L., & Amara, S. G. (2014). Amphetamine Modulates Glutamatergic Neurotransmission through Endocytosis of the Excitatory Amino Acid Transporter EAAT3 in Dopamine Neurons. *Neuron*, *83*(2), 404–416. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.043>.
- Ungless, M. A., Singh, V., Crowder, T. L., Yaka, R., Ron, D., & Bonci, A. (2003). Corticotropin-releasing factor requires CRF binding protein to potentiate NMDA receptors via CRF receptor 2 in dopamine neurons. *Neuron*, *39*(3), 401–407. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00461-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00461-6)
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2011). *Amphetamines and Ecstasy - 2011 Global ATS Assessment*. http://www.unodc.org/documents/ATS/ATS_Global_Assessment_2011.pdf
- Utrilla, P. (2000). Aspectos farmacológicos de las anfetaminas Pharmacological Aspect of Amphetamines. *Ars Pharmaceutica*, *41*(1), 67–77.
- Valjent, E., Corvol, J.-C., Trzaskos, J. M., Girault, J.-A., & Hervé, D. (2006). Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neuroscience*, *7*, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-20>
- Valzachi, M. C., Teodorov, E., Marcourakis, T., Bailey, A., & Camarini, R. (2013). Enhancement of Behavioral Sensitization, Anxiety-Like Behavior, and Hippocampal and Frontal Cortical CREB Levels Following Cocaine Abstinence in Mice Exposed to Cocaine during Adolescence. *PLoS ONE*, *8*(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078317>
- Van Troys, M., Huyck, L., Leyman, S., Dhaese, S., Vandekerckhove, J., & Ampe, C. (2008). Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *European Journal of Cell Biology*, *87*(8–9), 649–667. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.04.001>
- Vanderschuren, L. J. M. J., & Kalivas, P. W. (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of

- preclinical studies. *Psychopharmacology*, *151*(2–3), 99–120. <https://doi.org/10.1007/s002130000493>
- Vanderschuren, Louk J.M.J., Di Ciano, P., & Everitt, B. J. (2005). Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. *Journal of Neuroscience*, *25*(38), 8665–8670. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0925-05.2005>
- Vásquez, C. E., Riener, R., Reynolds, E., & Britton, G. B. (2014). NMDA receptor dysregulation in chronic state: A possible mechanism underlying depression with BDNF downregulation. *Neurochemistry International*, *79*, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.09.007>
- Vezina, P., & Queen, A. L. (2000). Induction of locomotor sensitization by amphetamine requires the activation of NMDA receptors in the rat ventral tegmental area. *Psychopharmacology*, *151*(2–3), 184–191. <https://doi.org/10.1007/s002130000463>
- Vezina, Paul. (2004). Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *27*(8), 827–839. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.001>
- Vocci, F., & Ling, W. (2005). Medications development: Successes and challenges. *Pharmacology & Therapeutics*, *108*(1), 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.06.010>
- Volkow, N. D., & Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, *162*(4), 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>
- Walters, C. L., & Blendy, J. a. (2001). Different requirements for cAMP response element binding protein in positive and negative reinforcing properties of drugs of abuse. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(23), 9438–9444.
- Wang, J., Fanous, S., Terwilliger, E. F., Bass, C. E., Hammer, R. P., & Nikulina, E. M. (2013). BDNF overexpression in the ventral tegmental area prolongs social defeat stress-induced cross-sensitization to amphetamine and increases Δ fosB expression in mesocorticolimbic regions of rats. *Neuropsychopharmacology*, *38*(11), 2286–2296. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.130>
- Wang, Y. C., & Hsiao, S. (2003). Amphetamine sensitization: Nonassociative and associative components. *Behavioral Neuroscience*, *117*(5), 961–969. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.5.961>
- Watson, F. L., Heerssen, H. M., Bhattacharyya, A., Klesse, L., Lin, M. Z., & Segal, R. A. (2001). Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nature Neuroscience*, *4*(10), 981–988. <https://doi.org/10.1038/nn720>
- Wayman, G. a, Davare, M., Ando, H., Fortin, D., Varlamova, O., Cheng, H.-Y. M., Marks, D., Obrietan, K., Soderling, T. R., Goodman, R. H., & Impey, S. (2008). An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26), 9093–9098. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803072105>
- Williams, S. N., & Undieh, A. S. (2009). Dopamine D1-like receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroreport*, 20(6), 606–610. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32832a0a98>
- Winograd, M., & Viola, H. (2004). Detection of novelty, but not memory of spatial habituation, is associated with an increase in phosphorylated cAMP response element-binding protein levels in the hippocampus. *Hippocampus*, 14(1), 117–123. <https://doi.org/10.1002/hipo.10153>
- Wyvell, C. L., & Berridge, K. C. (2001). Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: Increased cue-triggered “wanting” for sucrose reward. *Journal of Neuroscience*, 21(19), 7831–7840. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-19-07831.2001>
- Xu, M., Guo, Y., Vorhees, C. V., & Zhang, J. (2000). Behavioral responses to cocaine and amphetamine administration in mice lacking the dopamine D1 receptor. *Brain Research*, 852(1), 198–207. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02258-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02258-1)
- Yager, L. M., Garcia, A. F., Wunsch, A. M., & Ferguson, S. M. (2015). The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. *Neuroscience*, 301, 529–541. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.033>
- Zarranz, J. J., Meana, J., & González-Menacho, J. (2011). *Neurofarmacología contemporánea*. Elsevier.
- Zhang, Y., Zhu, X., Huang, C., & Zhang, X. (2015). Molecular changes in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens are associated with blocking the behavioral sensitization to cocaine. *Scientific Reports*, 5(August), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep16172>
- Zweifel, L. S., Parker, J. G., Lobb, C. J., Rainwater, A., Wall, V., Fadok, J. P., Darvas, M., Kim, M. J., Mizumori, S. J. Y., Paladini, C. A., Phillips, P. E. M., & Palmiter, R. D. (2009). Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7281–7288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813415106>