



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Biología Celular y Molecular

**LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA M ζ SE
REQUIERE PARA LA EJECUCION DE LAS CONDUCTAS
MOTIVADAS EN EL AREA DEL TEGMENTO VENTRAL**

MARÍA RAQUEL IBÁÑEZ HORMAZÁBAL

AGOSTO 2013



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Biología Celular y Molecular

**LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA M ζ SE
REQUIERE PARA LA EJECUCION DE LAS CONDUCTAS
MOTIVADAS EN EL AREA DEL TEGMENTO VENTRAL**

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile como parte de los
requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología
Celular y Molecular

Por

MARÍA RAQUEL IBÁÑEZ HORMAZÁBAL

DIRECTORA DE TESIS: DRA. KATIA GYSLING CASELLI

COMISION DE TESIS: DR. FELIPE BARROS O.
DR. ALFONSO GONZALEZ DE LA R.
DR. NIBALDO INESTROSA C.

AGOSTO 2013



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Biología Celular y Molecular

La defensa final de la tesis titulada:

**LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA M ζ SE
REQUIERE PARA LA EJECUCION DE LAS CONDUCTAS
MOTIVADAS EN EL AREA DEL TEGMENTO VENTRAL**

Presentada con fecha de hoy por el candidato a Doctor en Ciencias Biológicas

MARÍA RAQUEL IBÁÑEZ HORMAZÁBAL

Ha sido aprobada por el Tribunal Examinador, constituido por los profesores abajo firmantes, calificándose el trabajo realizado, el manuscrito sometido y la defensa oral con nota _____

Prof. Katia Gysling C.

Director de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Prof. Juan Correa M.

Decano
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Prof. Alejandra Alvarez R.

Jefa de la Mención
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Prof. Felipe Barros O.

Miembro Comisión de Tesis
Centro de Estudios Científicos
CECS

Prof. Nivaldo Inestrosa C.

Miembro Comisión de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Prof. Alfonso González de la R.

Miembro Comisión de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Santiago de Chile, 21 de Agosto de 2013

*Dedicada a mi mamá
María Cristina*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Katia Gysling, por acogerme en su laboratorio y por permitirme la libertad de desarrollar las ideas y experimentos de manera independiente, proceso fundamental en mi formación. Quisiera también agradecerle su apoyo y comprensión en los ámbitos de la vida que van mas allá de la ciencia, lo que facilitó de manera importante estos años de doctorado. También quisiera agradecerle su constante apoyo, motivación y confianza para realizar otras actividades, como actividades docentes y actividades de extensión que han delineado de manera positiva lo que soy ahora como científico y persona.

A cada uno de los miembros de la comisión. Doctores Felipe Barros, Nivaldo Inestrosa y Alfonso González, por su disposición a revisar esta tesis y por su crítica constructiva. A la Dra. Alejandra Álvarez por su constante preocupación por el avance de esta tesis y sus aportes críticos.

A la Dra Estela Andrés y a la gente de su laboratorio por sus comentarios constructivos y por sus aportes siempre relevantes y diferentes.

A los Señores Hector Casanova, Lucy Chacoff y Soledad Gacia por su incansable labor en el funcionamiento diario del laboratorio, que fueron cruciales en el progreso de esta tesis.

A mis amigas y compañeras de doctorado Katherine Araya y Karen Fuenzalida por su apoyo constante, por entregarme alegría en el día a día, por compartir conmigo dichas y penas tanto científicas como no. Y por ser una luz en tiempos de oscuridad.

A mis amigos Roberto Munita, Veronica Noches y Javier Fuenzalida por compartir su sabiduría científica y por todas aquellas conversaciones que le dieron un toque especial a todos estos años de doctorado. Por su amistad sincera que espero que se mantenga por muchos años.

A los integrantes del laboratorio de Biología Celular y Molecular de la adicción, a todos aquellos que aún están en el lab y aquellos que ya no. Les agradezco su compañía diaria, la camaradería, el espíritu de equipo y los comentarios siempre útiles.

A Jaime Eugenin y Francisca Martínez por todas las discusiones científicas que nos llevaron a madurar las ideas y a adquirir una opinión objetiva de distintos temas en ciencia. Por compartir conmigo las frustraciones sin dejar de sonreír. Por ser parte de mi familia científica.

En especial quiero agradecer a mi familia: a mi esposo, a mis hermanos y hermanas, cuñadas y cuñado, a mis sobrinos por ser un apoyo constante en este camino. A mis papás, a quienes debo todo lo que soy, quienes me inculcaron de manera inconsciente este amor por la ciencia y son mi principal fuente de apoyo.

Por último, quiero agradecer a mi Fernanda, quien es mi motor principal para sacar las cosas adelante. Quién con su alegría supo compartir su tiempo con esta tesis.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis recibió los siguientes apoyos financieros de las fuentes que se señalan a continuación:

1. Beca para estudio de doctorado en Chile, CONICYT, años 2007-2011
2. Beca de apoyo para la realización de tesis doctoral, CONICYT, años 2009-2010
3. Beca de residencia para alumnos de doctorado, Vicerrectoría de Investigación (VRI), P. Universidad Católica de Chile, años 2011-2012.
4. Beca CAEN otorgado por la *International Society for Neurochemistry* (ISN) para asistencia a congreso FENS-EMCCS, en Amsterdam, Holanda, 2010.
5. Beneficio de asistencia a congresos internacionales, Vicerrectoría de Investigación (VRI) y Dirección de Postgrado, P. Universidad Católica de Chile. Año 2010.
6. Proyectos Nucleo Milenio Estrés y Adicción: NEDA y Fondecyt de la Dra. Katia Gysling.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iv
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCION.....	1
1.1 Conductas motivadas y circuito de la motivación.....	1
1.1.1 Circuito de la motivación: Área del tegmento ventral y Núcleo accumbens.....	5
Área del tegmento ventral	5
Núcleo accumbens.....	8
1.1.2 Papel central de la dopamina en las conductas motivadas.....	9
1.2 Drogas de abuso y adicción.....	14
1.2.1 Mecanismo de acción de las drogas de abuso.....	14
1.2.2 Usurpación del circuito de la recompensa por las drogas de abuso.....	17
1.3 Cambios plásticos en el VTA.....	18
1.3.1 Plasticidad en VTA y drogas de abuso.....	18
1.3.2 Cambios moleculares inducidos por drogas de abuso en el circuito de la motivación.....	19
1.4 Aprendizaje y memoria.....	22
1.4.1 Plasticidad en memoria asociativa.....	22
1.4.2 Papel de la proteína quinasa m ζ en aprendizaje y memoria.....	22

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
MATERIALES	30
MÉTODOS	31
Animales y cirugía.....	31
Microdissección del VTA.....	32
PCR y qPCR.....	33
Western Blot e inmunoprecipitación.....	37
Actividad de PKC/PKM ζ <i>in vitro</i>	38
Hibridización <i>in situ</i>	39
Prueba de preferencia de lugar inducida por anfetamina.....	40
Entrenamiento con comida.....	47
Infusión de ZIP o ZIP-scr.....	47
Microdiálisis <i>in vivo</i> en animal despierto.....	47
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	48
Análisis estadístico	48
III. RESULTADOS.....	49
1.1 Expresión de PKM ζ en el VTA.....	49
1.1.1 PKM ζ se expresa en el VTA de rata.....	49
1.1.2 PKM ζ se expresa tanto en neuronas dopaminérgicas como en neuronas no dopaminérgicas del VTA de rata.....	50
1.2 Determinación de los niveles de PKM ζ en el VTA luego del entrenamiento con recompensantes.....	56

1.2.1 El mensajero de PKM ζ no cambia sus niveles luego del entrenamiento con recompensantes.....	57
1.2.2 La expresión de PKM ζ no cambia luego del entrenamiento con recompensantes...	56
1.2.3 Los niveles del mensajero de PKM ζ varían durante el entrenamiento con anfetamina pero llegan a un estado estable.....	56
1.3 Determinación de la actividad de PKM ζ en lisado total del VTA de ratas tratadas con anfetamina.....	61
1.3.1 PKM ζ y PKC ζ se encuentran fosforiladas en el VTA de ratas tratadas con anfetamina.....	61
1.3.2 La actividad de PKC ζ /PKM ζ <i>in vitro</i> muestra una tendencia de aumento en el VTA de ratas tratadas con anfetamina.....	62
1.4 Efecto de la inhibición <i>in vivo</i> de PKC ζ /PKM ζ , en el VTA de rata, sobre las conductas motivadas.....	66
1.4.1 La inhibición de PKC ζ /PKM ζ en el VTA, inmediatamente post entrenamiento, disminuye la búsqueda por recompensantes.....	66
1.4.2 La búsqueda de recompensantes se recupera luego de una semana post inhibición..	69
1.4.3 La inhibición de PKM ζ en el VTA de ratas abstinentes disminuye la búsqueda de recompensantes.....	74
1.5 La inhibición de PKCz/PKM ζ disminuye los niveles de dopamina en el NAcc.....	77
IV DISCUSION	79
V. CONCLUSIONES Y DIRECCIONES FUTURAS.....	102
REFERENCIAS.....	105

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1 : Circuito de la motivación.....	4
FIGURA 2: Niveles extracelulares de DA en respuesta a recompensantes.....	13
FIGURA 3: Esquema de la estructura química de diferentes drogas de abuso.....	15
TABLA 1: Efecto de la acción aguda de distintas drogas de abuso.....	16
FIGURA 4: Efecto de recompensantes sobre la transmisión glutamatérgica en el VTA.....	21
FIGURA 5: Organización del gen de PKC ζ y comparación entre PKC ζ y PKM ζ	25
FIGURA 6: Curvas de eficiencia de la amplificación por qPCR de ciclofilina y PKM ζ	33
FIGURA 7: Protocolo de entrenamiento con recompensantes.....	40
FIGURA 8: Expresión de PKM ζ y PKC ζ en el VTA de rata.....	49
FIGURA 9: Caracterización de la expresión de PKM ζ en el VTA de rata.....	51
FIGURA 10: Caracterización del fenotipo que expresa PKM ζ en el VTA de rata.....	53
FIGURA 11: La expresión de PKM ζ no cambia luego del entrenamiento con recompensantes	58
FIGURA 12: Actividad de PKM ζ y PKC ζ luego del entrenamiento con anfetamina.....	64
FIGURA 13: Efecto de ZIP, un inhibidor de PKC ζ /PKM ζ , sobre el comportamiento de búsqueda de alimento.	70
FIGURA 14: Efecto de ZIP, un inhibidor de PKC ζ /PKM ζ , sobre el comportamiento de búsqueda de anfetamina.....	72
FIGURA 15: Efecto de ZIP, un inhibidor de PKC ζ /PKM ζ sobre el comportamiento de búsqueda de anfetamina en ratas abstinentes.....	76

FIGURA 16. Efecto de la inhibición de PKC ζ /PKM ζ en los niveles extracelulares de dopamina en el NAcc.....	78
FIGURA 17: Comportamiento de cada rata en los paradigmas conductuales respectivos	92
FIGURA 18: Fosforilación de Tirosina Hidroxilasa.....	97

ABREVIATURAS

Akt	Proteína Quinasa B
AMPA	Ácido 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-il) propanoico
ANF	Anfetamina
aPKC	Proteínas quinasa C atípicas
BSA	Albúmina de suero de bovino
CB1	Receptor de Cannabinoides tipo 1
CPP	Prueba de preferencia de lugar condicionado
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
Cyc	Ciclofilina
D1	Receptor de dopamina D1
D2	Receptor de dopamina D2
DA	Dopamina
FR	Razón fija de entrenamiento
GABA	Ácido γ aminobutírico
GAD	Glutámico descarboxilasa
HPLC-EC	Cromatografía líquida de alto rendimiento con detección electroquímico
i.p	Inyección intraperitoneal
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina 1
IRS-2	Sustrato del receptor de insulina 2
LTP	Potenciación a largo plazo

LTD	Depresión a largo plazo
MSN	Neuronas espinosas medianas
NAcc	Núcleo Accumbens
nAChR	Receptor de Acetilcolina
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NSF	Factor sensible a N-etilmaleimida
O.N	Toda la noche
PBP	Área parabraquial pigmentada
PCA	Ácido perclorico acético
PDK1	Proteína quinasa dependiente de fosfoinositol 1
PKC ζ	Proteína quinasa C ζ
PKM ζ	Proteína quinasa M ζ
PFC	Corteza Prefrontal
PFR	Área Parafasciculus retroflexus
PN	Área Paranigral
RIPA	Solución tampón para Radio inmunoprecipitación
SAL	Suero salino 0,9%
SEM	Error estándar de la media
SSC	Solución tampón de Citrato de Sodio Salino
TH	Tirosina Hidroxilasa
THC	Tetrahidrocannabinol
VEH	Vehículo

VTA	Área del Tegmento Ventral
VTT	Cola ventral tegmental
ZIP	Péptido Inhibidor de PKC ζ /PKM ξ
ZIP-scr	Péptido de secuencia desordenada del inhibidor de PKC ζ /PKM ξ

RESUMEN

El Área del tegmento ventral (VTA) es una zona central en el sistema neuronal, llamado circuito de la motivación, que controla las respuestas de refuerzo a los estímulos naturales (tales como alimento) y a las drogas de abuso. El circuito de la motivación esta formado por VTA, Núcleo Accumbens y Corteza Pre-frontal, entre otras áreas.

Se ha descrito que la activación de VTA induce una liberación de dopamina (DA) en los terminales presentes en Núcleo Accumbens y en otras áreas cerebrales. Esta liberación de DA ha sido altamente asociada al procesamiento de las recompensas.

Todas las drogas de abuso activan, directa o indirectamente, las neuronas dopaminérgicas del VTA. Se ha descrito que esta activación genera cambios plásticos en el circuito. Estos cambios serían los responsables de generar las modificaciones del comportamiento inducidas por las drogas de abuso. Y además, serian necesarios para la repetición de la conducta en el tiempo. Se ha demostrado que los recompensantes naturales y las drogas de abuso inducen una potenciación a largo plazo en las neuronas dopaminérgicas del VTA.

Se ha sugerido que existe un mecanismo molecular común en la potenciación a largo plazo. Varios estudios, en diversas áreas cerebrales, han demostrado que la Proteína Quinasa M ζ (PKM ζ) es a la vez, necesaria y suficiente, para la mantención de la potenciación y de las memorias asociativas a largo plazo.

PKM ζ pertenece a la super familia PKC, que corresponden a quinasas del tipo serina y treonina. PKM ζ se expresa a partir de un promotor interno localizado en el intrón 4 del gene de PKC ζ . Debido a esto, PKM ζ y PKC ζ son idénticas en su subunidad catalítica. PKC ζ presenta un dominio regulatorio de autoinhibición que se libera de manera regulada, en cambio PKM ζ , al carecer de dominio regulatorio se encuentra constitutivamente activa. Ambas isoformas requieren, para su actividad completa, la fosforilación en un residuo de treonina. Esta fosforilación la realiza la enzima PDK-1

En este trabajo se investigó el papel de PKM ζ en la memoria asociativa inducida por recompensantes, tanto naturales como droga de abuso. La memoria asociativa se evaluó midiendo la conducta inducida por recompensantes. Para ello, se utilizó ratas entrenadas con anfetamina, utilizando el paradigma de preferencia de lugar condicionado, y ratas entrenadas con comida, en un paradigma de autoadministración. En primer lugar, encontramos que el entrenamiento con anfetamina indujo un aumento en la fosforilación de PKM ζ , sin generar cambios en los niveles de expresión, ni del mensajero ni de la proteína. La observación del aumento en la fosforilación de PKM ζ sugiere un aumento en su actividad inducida por el tratamiento con anfetamina.

Para poder demostrar si la actividad PKM ζ está involucrada en la conducta de búsqueda de recompensa decidimos inhibir PKM ζ directamente en VTA. El comportamiento tipo adictivo se midió como el tiempo que la rata pasa en el compartimento asociado a la anfetamina y la búsqueda de alimento se midió como el número de veces que se aprieta la palanca activa. Mediante la realización de los experimentos en ambos paradigmas, se encontró

que una sola inyección intra-VTA del inhibidor de PKM ζ , disminuyó la búsqueda por el recompensante, independiente de la naturaleza de este y del tipo de entrenamiento.

A diferencia de lo encontrado en otras áreas cerebrales, el efecto sobre la conducta de la inhibición de PKM ζ en VTA es reversible. Este resultado junto con la observación de que obtenemos una disminución en la búsqueda incluso en ratas abstinentes, con el mismo patrón de recuperación de la conducta, nos llevó a proponer que en VTA, la actividad de PKM ζ no está relacionada a la memoria sino más bien, está involucrada al funcionamiento fisiológico del VTA. Para probar esta nueva hipótesis, se realizó la determinación de los niveles extracelulares de DA en Núcleo accumbens en ratas que se encuentran realizando el paradigma conductual. Nuestros resultados muestran una disminución en los niveles extracelulares de DA después de la inhibición PKM ζ . Por lo que la actividad de PKM ζ sería requerida para la activación de VTA en respuesta a la presentación de claves asociadas con el recompensante. Con estos resultados se sugiere una nueva función de PKM ζ en VTA. PKM ζ controlaría los niveles extracelulares de DA en la búsqueda de recompensa, planteando a PKM ζ como un nuevo regulador de la actividad de VTA.

ABSTRACT

The ventral tegmental area (VTA) is a central area in the neuronal system, called motivational circuit that controls the booster responses to natural stimuli (such as food) and drugs of abuse. The motivational circuit consists of VTA, Nucleus Accumbens and Pre-frontal cortex, among other areas.

Activation of VTA induces a release of dopamine (DA) into the terminals present in Nucleus Accumbens and other brain areas. This release of DA has been highly associated with reward processing.

All drugs of abuse activate, directly or indirectly, VTA dopaminergic neurons. This activation generates plastic changes in the circuit. These changes would be responsible for generating the behavioral changes induced by drugs of abuse. Moreover, would be necessary to repeat the behavior in time. It has been shown that natural stimuli and drugs of abuse induce a long-term potentiation in VTA dopamine neurons.

It has been suggested that there is a common pathway in the long-term potentiation. Several studies in different brain areas have shown that protein kinase M ζ (PKM ζ) is both necessary and sufficient for maintaining and enhancing long term associative memories.

PKM ζ belongs to the super family PKC kinases corresponding to serine and threonine kinases. PKM ζ is expressed from an internal promoter located in intron 4 of PKC ζ gene. Because of this, PKM ζ and PKC ζ are identical in its catalytic subunit. PKC ζ presents an autoinhibitory regulatory domain that is released in a regulated manner, however PKM ζ , lacking the regulatory domain, is constitutively active. Both isoforms for full activity require phosphorylation on a threonine residue, by the enzyme, PDK-1.

In this work we investigated the role of PKM ζ on the associative memory induced by both, natural and drug abuse. For this, we used rats trained with amphetamine, using the paradigm of conditioned place preference, and rats trained with food, in a self-administration paradigm. First, we found that training with amphetamine induced an increase in the phosphorylation of PKM ζ , without causing changes in the expression levels of messenger or protein. Observing the increase in the phosphorylation of PKM ζ suggests an increase in activity induced by amphetamine treatment.

In order to demonstrate whether PKM ζ activity is involved in reward-seeking behavior we inhibit PKM ζ directly in VTA. Addictive behavior was measured as the time spent in the compartment associated with amphetamine and food-seeking was measured as the number of times that the rat presses the active lever. By conducting the experiments at both paradigms, we found that a single injection intra-VTA of PKM ζ inhibitor decreased the reward-seeking independent of the nature of this and the type of training.

Unlike what was found in other brain areas, the effect on behavior of PKM ζ inhibition in VTA is reversible. This result together with the observation that we obtain a reduction in the seeking even in abstinent rats, with the same pattern of behavioral recovery, led us to propose that VTA PKM ζ activity not related to memory but rather, is involved in the physiological functioning of the VTA. To test this new hypothesis, we performed the determination of extracellular DA levels in the nucleus accumbens in rats who are conducting the behavioral paradigm. Our results show a decrease in extracellular levels of DA after inhibition PKM ζ . So PKM ζ activity would be required for activation of VTA in response to the presentation of keys associated with the rewarding. These results suggest a new function in VTA PKM ζ . PKM ζ would control the extracellular levels of DA in reward seeking, proposing to PKM ζ as a new regulator of the activity of VTA.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 CONDUCTAS MOTIVADAS Y CIRCUITO DE LA MOTIVACIÓN

Los animales generan una respuesta frente a los estímulos externos que reciben. La respuesta que el animal adquiere posterior al estímulo es lo que se denomina comportamiento emocional positivo. Estudios pioneros realizado por el psicólogo experimental B.F Skinner permitieron medir el grado de satisfacción de un estímulo (o recompensa) en términos de la frecuencia con que el animal vuelve a realizar el acto que condujo a la recompensa [1]. Si el estímulo aumenta la frecuencia de las respuestas, se considera que es un estímulo reforzante o recompensante, si disminuye la frecuencia de las respuestas es un estímulo de castigo y si no altera la frecuencia de las respuestas se considera como un estímulo neutro [2].

En este tipo de estudios, el animal se coloca en una caja que contiene una palanca que el animal puede manipular. Si no recibe recompensa cuando presiona la palanca, el animal realiza este acto entre cinco y 10 veces por hora de manera azarosa. Pero si el animal es recompensado, por ejemplo con comida, cada vez que aprieta la palanca, la tasa de apretar la palanca se eleva a 100 o más veces por hora [1, 2]. Este aumento en la frecuencia de las respuestas corresponde a una medida del efecto recompensante de la comida. Diferentes estímulos producen distintas tasas de respuesta, y en cada caso el aumento de la tasa es una medida precisa del valor de premio del estímulo dado [2].

Hoy en día se ha aceptado que los estímulos recompensantes se pueden subdividir en dos grupos: recompensantes naturales y drogas de abuso. Al grupo de los recompensantes naturales pertenecen la comida, el agua, el sexo, las interacciones sociales, etc., mientras que las drogas de abuso abarcan un grupo heterogéneo de compuestos químicos como cocaína, anfetaminas, morfina y alcohol, entre otras [3].

El diseño experimental de Skinner [1] permitió el desarrollo de los experimentos pioneros y revolucionarios de James Olds en la década del 50 [2]. Olds realizó una serie de experimentos de auto-estimulación intra-cranial en ratas, los cuales consistían en colocar electrodos de estimulación en diferentes zonas del cerebro. Utilizando las cajas diseñadas por Skinner (de ahora en adelante llamadas cámaras operantes), las ratas podían realizar la estimulación eléctrica directa de las zonas del cerebro apretando la palanca. De esta forma, los investigadores demostraron la existencia de varias zonas del cerebro que el animal estimulaba de forma repetida y sostenida, proponiendo la existencia de zonas del cerebro encargadas de los refuerzos recompensantes. Con estos hallazgos se logró sugerir que los mecanismos motivacionales del comportamiento se encuentran en el cerebro [2, 4, 5] y de esta forma sentar las bases fisiológicas del comportamiento en respuesta a los estímulos.

En estudios de auto-estimulación eléctrica posteriores [6] se demostró que una región localizada en el mesencéfalo ventral presenta una de las mayores tasas de auto-estimulación. Hoy en día se ha identificado dicha zona del cerebro como área del tegmento ventral o VTA.

Mediante los estudios de auto-estimulación intracraneal se logró identificar que el comportamiento en respuesta a la recompensa no está mediado por una zona aislada del cerebro, si no que más bien, está mediado por un circuito compuesto por varias zonas distribuidas por todo el cerebro. Este circuito es capaz de recibir los estímulos reforzantes y ejecutar las conductas motivacionales en respuesta a ellos.

La presencia de este circuito permite una respuesta apropiada a los estímulos recompensantes, aspecto que es evolutivamente importante para la sobrevivencia de las especies, reproducción y “fitness” (eficacia biológica) lo cual es esencial para la vida [3, 7]. Debido a esto, no es extraño encontrar que la existencia de un sistema de recompensa se conserva en muchas especies, incluida la mosca drosófila, roedores y seres humanos [7]. A este circuito cerebral se le denominó inicialmente circuito del placer y hoy en día recibe el nombre de **circuito de la recompensa** o **circuito de la motivación** [3, 7]. Se ha descrito que la base del circuito de la recompensa consiste en un sistema formado por el área del tegmento ventral (VTA) en el mesencéfalo, por Núcleo accumbens (NAcc) en la región límbica y por la corteza prefrontal (PFC) (circuito meso-cortico-límbico). La distribución anatómica de los núcleos que forman este circuito se ilustra en la figura 1.

FIGURA 1

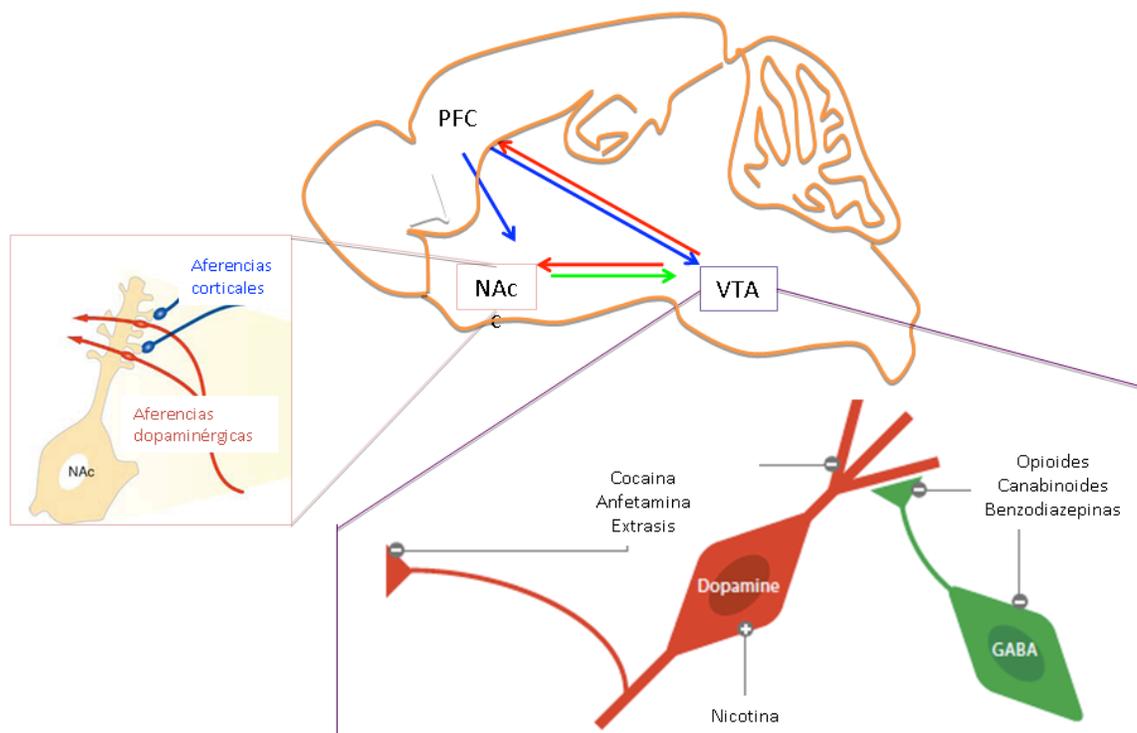


Figura 1: Circuito de la motivación. Esquema de un corte sagital de un cerebro de rata donde se muestra la distribución anatómica del sistema basal del circuito de la motivación: área del tegmento ventral, Núcleo accumbens y corteza prefrontal (VTA-NAcc-PFC). Además se ilustra las conexiones neuronales entre ellos. Las flechas azules indican neuronas glutamatergicas, las flechas rojas indican neuronas dopaminérgicas y las flechas verdes neuronas GABAérgicas. (Modificado de Hyman y cols., *Annu. Rev. Neurosci.* 2006 [3] y de Luscher y Malenka., *Neuron*, 2011[8])

Se ha descrito que el punto de partida del circuito lo genera la activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA, las cuales envían proyecciones hacia el NAcc y la PFC. En este circuito el VTA, a su vez, recibe proyecciones de ambos núcleos [3, 9] (Figura 1)

Si bien el circuito de la recompensa está formado basalmente por VTA-NAcc-PFC, hoy en día se ha aceptado que existen otras áreas relevantes para la función del circuito como son: hipotálamo [10-12], septum lateral [13], amígdala extendida [14-16], hipocampo [17], corteza insular [18], entre otros. La mayoría de estas zonas cerebrales son inervadas por proyecciones desde el VTA, aunque el mayor número de proyecciones desde el VTA lo recibe el NAcc [9, 19]

1.1.1. Circuito de la motivación: Área del Tegmento Ventral y Núcleo accumbens

Área del tegmento ventral

Como área principal del circuito de la recompensa se encuentra el área del VTA. Esta área está localizada en la base del cerebro medio, formada por un grupo heterogéneo de neuronas, que presentan distintos blancos anatómicos y funcionales [9, 20-22]

La caracterización neuronal del VTA ha determinado que en él co-existen diferentes fenotipos neuronales: neuronas dopaminérgicas de proyección [9], interneuronas GABAérgicas [15], neuronas GABAérgicas de proyección [16] y neuronas glutamatérgicas de proyección [23]

A nivel anatómico, el VTA se ha caracterizado y organizado en 4 sub-regiones: región paranigral (PN), Área parabraquial pigmentada (PBP), área parafasciculus retroflexus (PFR) y cola ventral tegmental (VTT) [9]. Mediante la inmuno-detección de tirosina hidroxilasa, enzima limitante de la síntesis de dopamina, se ha establecido que PN y PBP son regiones abundantes en neuronas dopaminérgicas, en cambio PFR y VTT son regiones pobres en neuronas dopaminérgicas (revisado en [9]).

A nivel funcional el VTA es un área central en las conductas motivadas, aprendizaje basado en recompensa, predicción de error e importancia del estímulo, [24] revisado en [25]. Las neuronas del VTA más estudiadas son el grupo de neuronas dopaminérgicas, y se ha descrito que la liberación de dopamina juega un papel central en las conductas motivadas (ver más adelante).

Además, es el VTA el que media los efectos recompensantes de las drogas de abuso. Se ha demostrado que lesiones selectivas de las neuronas del VTA atenúan la autoadministración de drogas de abuso [26]. Más aún, se ha demostrado que es la zona posterior del VTA la que participa en los efectos recompensantes de las drogas de abuso. En experimentos de autoadministración en ratas, éstas se autoadministran drogas como cocaína [27], nicotina [28], opiáceos [29], cannabinoides [30], etanol [22, 31] más fácilmente en el VTA posterior que en el anterior.

Es así que varios experimentos indican que el VTA anterior y posterior juegan distintos papeles en la preferencia de lugar inducida por cocaína y opiáceos [32-34]. El VTA anterior y posterior también difiere en la expresión de receptores en la superficie [32, 35]. Esta segregación anatómica se ha hecho evidente con estudios de sobre expresión diferencial de moléculas de señalización en el VTA y su correlato con conductas de preferencia o aversión.

Se ha demostrado que la sobre expresión de la subunidad GluR1 del receptor de glutamato tipo AMPA y de la enzima fosfolipasa C en regiones anteriores del VTA aumentan la preferencia por morfina. Sin embargo, cuando las mismas moléculas son sobre expresadas en áreas posteriores del VTA se produce aversión [36, 37]. Sin embargo, se ha sugerido también que las regiones anterior y posterior del VTA ejercerían más bien un control de las distintas expresiones de la conducta asociada a recompensantes [38]. Además, se ha propuesto que es la región medial-posterior del VTA la que participa en las conductas asociadas a estímulos recompensantes [27, 28].

En VTA, no solo existe una organización antero-posterior, sino que además se ha descrito que las neuronas dopaminérgicas del VTA se organizan funcionalmente de manera dorso-ventral y medial-lateral; es así que se ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas del VTA dorsal se excitan con estímulos diferentes que las neuronas dopaminérgicas ventrales [39]. Además, se ha señalado que desde el VTA dorso-lateral se envía y se recibe proyecciones de la región de la corteza prefrontal [40], en cambio la región dorso-medial del VTA (PBP) proyecta hacia el área del Núcleo accumbens desde donde recibe proyecciones principalmente GABAérgicas [41]. Además, se ha descrito que las regiones ventro-medial del VTA proyectan hacia el septum lateral, a la habénula lateral e hipocampo [42].

Se ha descrito que la actividad de las neuronas del VTA es controlada por proyecciones glutamatérgicas. Se ha demostrado que la estimulación de las aferencias glutamatérgicas o la inyección de agonistas del receptor de glutamato intra-VTA, aumentan la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas y del disparo de tipo en ráfaga (burst) *in vivo* [43-46]. En este

mismo sentido el bloqueo de los receptores ionotrópicos de glutamato en el VTA atenúa la actividad en ráfaga de las neuronas del VTA [45].

A nivel neuroanatómico y electrofisiológico se ha descrito que las proyecciones excitatorias hacia el VTA provienen de la corteza prefrontal, lecho de la estría terminal (BNST), pedúnculo pontino e hipotálamo lateral [47].

El principal blanco anatómico del VTA es el Núcleo accumbens (NAcc), y se ha descrito que la actividad del VTA controla la actividad de este núcleo límbico.

Núcleo accumbens

El Núcleo accumbens (NAcc) corresponde a la zona ventral del estriado, fundamental para procesos motivacionales, la cognición y la conducta motora voluntaria [48].

Anatómica y fisiológicamente el NAcc se ha subdividido en “core” y “shell” [49]. La zona del “shell” cumple un papel en la respuesta a recompensantes y particularmente en la recompensa a drogas de abuso. Se ha descrito que las ratas aprenden a auto-administrarse agonistas del receptor de dopamina en el “shell” pero no en el “core” [50-54]. De igual manera, infusiones de antagonistas dopaminérgicos en el “shell” y no en el “core” interrumpen la preferencia inducida por drogas de abuso [55, 56].

Más del 90% de las células del NAcc corresponden a neuronas GABAérgicas denominadas neuronas espinosas medianas (MSN). Estudios en las MSN han demostrado que se dividen en dos subpoblaciones principales: MSN de la vía directa, las cuales expresan receptores de dopamina del tipo D1. Mientras que las MSN de la vía indirecta expresan en su mayor parte los receptores de dopamina del tipo D2. Las neuronas de la vía directa proyectan

principalmente al VTA, mientras que las neuronas de la vía indirecta proyectan preferencialmente al pallidum ventral, e influyen indirectamente en las neuronas DAérgicas [57].

En el NAcc, la actividad de las MSNs está controlada por proyecciones excitatorias provenientes de la corteza prefrontal, del hipocampo, y de la amígdala [58].

Estudios en el NAcc, han demostrado que las MSNs de la vía directa e indirecta exhiben propiedades electrofisiológicas y sinápticas diferentes [59] y debido a esta diferencia se ha sugerido que ambos tipos de MSN podrían jugar distintas funciones en el comportamiento relacionado con la adicción [60].

1.1.2. Papel central de la dopamina en las conductas motivadas

La transmisión dopaminérgica juega un papel fundamental en motricidad [61], aprendizaje de hábitos [62] y motivación [3, 63-65].

La desregulación del sistema dopaminérgico ha sido asociado a varias patologías como esquizofrenia [66] y adicción [3].

La función de la dopamina en la adicción se ha evaluado mediante estudios de depleción de dopamina, dónde se ha demostrado que una disminución en la cantidad de dopamina liberada en NAcc disminuye los efectos recompensantes de cocaína y anfetamina [67-71]. Similar resultado se obtiene lesionando los terminales dopaminérgicos en el shell del NAcc, pero no en el core. En este mismo sentido, se ha demostrado que inyectando directamente dopamina en NAcc se logra generar una preferencia por el lugar asociado a la inyección [72].

A nivel fisiológico se ha descrito que la presentación de un estímulo recompensante (natural o droga de abuso) genera un aumento en los niveles extracelulares de dopamina (DA) en el NAcc (Figura 2). Debido a esto, inicialmente se propuso que la dopamina correspondía a la representación interna del estado hedónico (placer), sin embargo, posteriormente se demostró que los animales pueden exhibir respuestas hedónicas positivas en ausencia de dopamina [24, 73-75]).

Más aún, se demostró que en animales hambrientos las neuronas dopaminérgicas disparan en respuesta a un sonido que los animales han aprendido a asociar con la comida (clave ambiental) [76] . Similarmente, la DA aumenta en animales sedientos cuando se les presenta un sonido asociado al agua [77]. De esta forma, las claves que predicen recompensa también son capaces de generar aumentos en los niveles de dopamina.

Los estudios electrofisiológicos en las neuronas dopaminérgicas han demostrado que cuando una neurona se activa, ésta dispara de manera fásica, mostrando disparos en ráfaga o “burst”. Recientemente, mediante técnicas optogenéticas se demostró que estimulando el disparo en ráfaga de las neuronas dopaminérgicas del VTA se induce la preferencia por el lugar asociado a la estimulación [78]. Además, con estudios electrofisiológicos se ha descrito también que las recompensas imprevistas (no esperadas) son capaces de generar aumentos fásicos en la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas [79]. Son precisamente estos cambios fásicos en la actividad de las neuronas dopaminérgicas, y no la simple liberación de DA, los que serían requeridos para la formación de la asociación entre clave y recompensa.

Pero, ¿Como este cambio fásico en la actividad de la neurona dopaminérgica se asocia a la recompensa y al aprendizaje mediado por recompensas? Hoy en día existen dos teorías ampliamente aceptadas por la comunidad científica. Estas son la teoría del *error de predicción de recompensa* [80] y la teoría de la *relevancia motivacional* (motivational salience) o "relevancia del incentivo" [81]. La primera, puesta a prueba experimentalmente por el grupo de Wolfram Schultz [82], mostró que el disparo de la neurona dopaminérgica corresponde a la señal de predicción de error. Utilizando registros electrofisiológicos de neuronas dopaminérgicas de mono, durante una tarea de discriminación dependiente de recompensa, los investigadores observaron que si el mono hace una elección correcta, y por lo tanto se entrega una recompensa, se provoca una respuesta en ráfaga de la actividad de la neurona dopaminérgica. Esta respuesta disminuye a cero al final del aprendizaje. Sin embargo, si se retrasa la entrega del recompensante, la actividad de la neurona dopaminérgica muestra una pausa. Sumado a otros estudios, se llegó a proponer que las señales de pausa en la actividad de la neurona dopaminérgica señalan un error de predicción negativo lo que implica que "las cosas son peores de lo esperado". En este mismo sentido, la actividad en ráfaga significa un error de predicción positivo, es decir que "las cosas son mejores de lo esperado". Y si la actividad se mantiene cerca de la línea de base es que "las cosas son tal como se espera" [81].

La segunda teoría, planteada inicialmente por Berridge y Robinson [24], propone que la dopamina media la unión entre la evaluación del carácter hedónico de los estímulos y la asignación de estos valores a los objetos o actos. Esta teoría propone que la recompensa contiene tres tipos de componentes: el querer (lo deseado), el aprendizaje y el gustar. En este sentido la dopamina sólo mediaría el componente de querer, entregando la relevancia del

estímulo, permitiendo que el estímulo y su recompensa asociada se conviertan en un aspecto motivacional. La liberación de dopamina transformaría la representación neural de un estímulo neutral (solamente información) en una representación atractiva que permita que los animales se esfuercen por adquirirla [24]. En esta hipótesis el sistema dopaminérgico (el querer) interactúa con el gustar y con los componentes de aprendizaje asociativo para generar la recompensa.

Existen otras teorías respecto al papel de la dopamina, pero las dos mencionadas anteriormente son las más aceptadas en el área de estudio. Estas dos teorías no son contrapuestas y hoy en día se ha aceptado que ambas pueden coexistir. Sin embargo, el papel central de la dopamina es consistente con funciones más amplias relacionadas con el aprendizaje que aun no han sido determinadas.

FIGURA 2

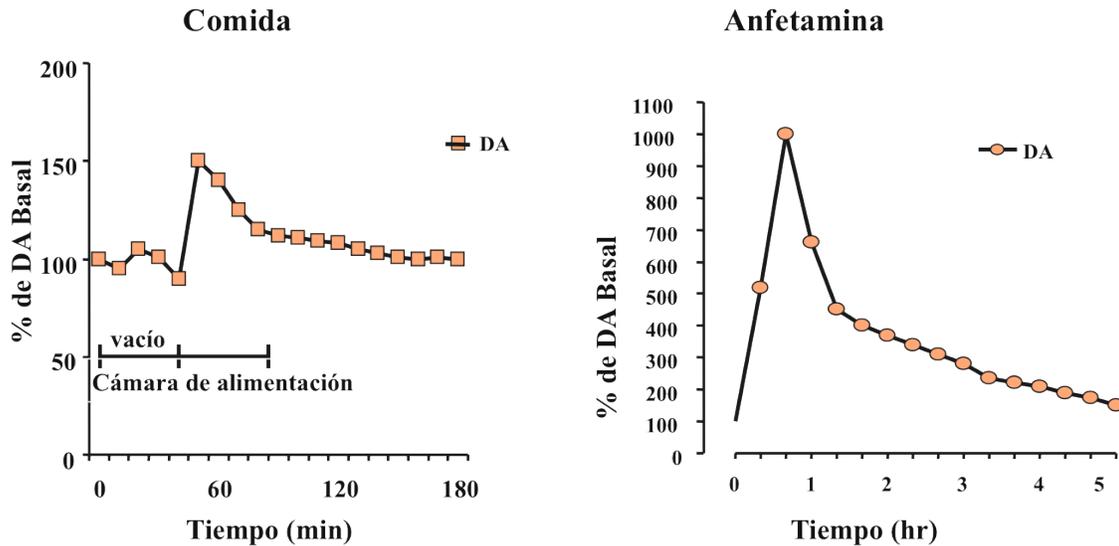


Figura 2: Niveles extracelulares de DA en respuesta a recompensantes. Niveles extracelulares de dopamina (DA) en el NAcc determinado por microdiálisis acoplado a HPLC. Izquierda: niveles extracelulares de DA en el tiempo, en respuesta a un recompensante natural (comida), y derecha: en respuesta a anfetamina.

(Recuperado de <http://www.drugabuse.gov/publications/addiction-science/why-do-people-abuse-drugs/natural-rewards-stimulate-dopamine-neurotransmission>; modificado de Bassareo y Di Chiara, *Neuroscience*, 1999 [83], Fiorino y Phillips, *J. Neuroscience*, 1997 [84])

1. 2 DROGAS DE ABUSO Y ADICCION

1.2.1 Mecanismo de acción de las drogas de abuso

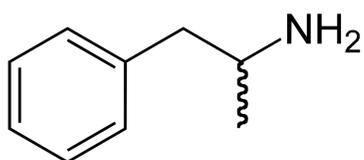
Como ya se mencionó, las drogas de abuso son un grupo químicamente heterogéneo de recompensantes. Debido a su efecto agudo en el organismo se han dividido en al menos 2 grupos: psicoestimulantes y drogas depresoras. En la figura 3 se muestra la estructura de algunas drogas de abuso.

Los psicoestimulantes reciben su nombre debido a que provocan un aumento en la alerta, movimiento, actividad y atención [85]. Son psicoestimulantes cocaína, anfetamina y nicotina [3]

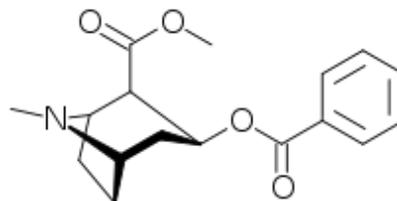
El grupo de los depresores reciben su nombre ya que disminuyen la actividad general del cerebro o de algunas zonas del cerebro. Son depresores, el alcohol, los opiáceos y la marihuana.

Todas las drogas de abuso, ya sea actuando directa o indirectamente [86, 87], aumentan los niveles extracelulares de dopamina en el NAcc [88, 89] (Tabla 1). De esta forma todas las drogas de abuso activan el sistema dopaminérgico, al igual que los recompensantes naturales, sin embargo se ha demostrado que el uso habitual de las drogas de abuso en el tiempo genera una activación repetida del circuito, lo que provoca cambios perdurables en las neuronas del sistema de la recompensa, lo que se discutirá a continuación.

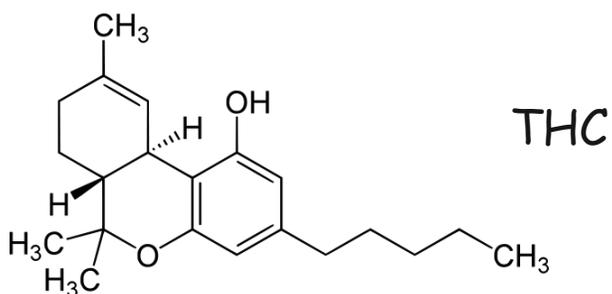
FIGURA 3



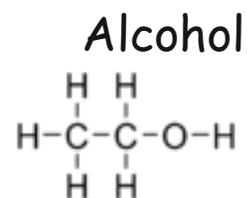
Anfetamina



Cocaína



THC



Alcohol

Figura 3: Esquema de la estructura química de diferentes drogas de abuso. Se muestra la estructura química de diferentes drogas de abuso. Psicoestimulantes: anfetamina y cocaína, drogas depresoras: alcohol y THC (componente activo de la marihuana).

TABLA 1

DROGA	ACCIÓN
Opiáceos	Agonista de los receptores opioides κ presentes en los terminales pre sinápticos de las neuronas del VTA [35, 90]. Agonista de los receptores μ y δ localizados en neuronas GABAérgicas del VTA [86]
Cocaína	Inhibidor de los transportadores de mono aminas en el terminal sináptico [91].
Anfetamina	Estimula la liberación de mono aminas [92]
Alcohol	Facilita la función del GABA [93], inhibe receptor de glutamato tipo NMDA [94]
Nicotina	Agonista de los receptores de acetilcolina (nAChRs) presentes en las neuronas dopaminérgicas del VTA [95]
Canabinoides	Agonista de los receptores de cannabinoides CB1 presentes en terminales GABAérgicos [96]

TABLA 1: Efecto de la acción aguda de distintas drogas de abuso. *Modificado de Nestler, Trends Pharmacol Sci, 2004 [97].*

1.2.2 Usurpación del circuito de la recompensa por las drogas de abuso

El uso repetido de drogas de abuso puede llegar a controlar el comportamiento humano mediante la producción de un estado que se llama adicción. La manifestación central de este estado es el uso compulsivo de la droga a pesar de consecuencias negativas graves, tales como, asociación a enfermedades médicas, deterioro en aspectos importantes de la vida, o la necesidad de participar en actividades delictivas para poder obtener la droga [98].

Se ha descrito que las respuestas a los recompensantes naturales y a las drogas de abuso presentan muchos puntos en común. Estos incluyen las respuestas hedónicas (placer), la motivación o "querer" y el aprendizaje asociativo dirigido a establecer comportamientos que permitan obtener la recompensa. Sin embargo, se ha propuesto que las recompensas obtenidas de las drogas de abuso tienden a ser sobrevaloradas a expensas de otras recompensas, contribuyendo al estado compulsivo. Debido a estas observaciones clínicas es que se ha sugerido que las drogas de abuso toman control del circuito de la motivación [99, 100].

A nivel fisiológico, se ha descrito que con la administración repetida de la droga de abuso, se producen adaptaciones homeostáticas dentro de las células y del circuito, resultando en fenómenos clínicos tales como tolerancia y dependencia [101]. Sin embargo, múltiples estudios en el área, han propuesto que la base fisiológica de la adicción subyace en los cambios a largo plazo en sinapsis específicas [3, 99], se han descrito cambios plásticos en distintas áreas del circuito. Si bien se ha conseguido avanzar en el campo de la adicción y se han caracterizado algunos de los cambios moleculares, los mecanismos moleculares que subyacen a la adicción todavía no están del todo dilucidados.

1.3 CAMBIOS PLASTICOS EN EL VTA

La sinapsis glutamatérgica en el VTA juega un rol esencial en las repuestas conductuales a las drogas de abuso. Experimentos dónde se bloquea farmacológicamente la sinapsis glutamatérgica en el VTA impiden el comportamiento asociado a los efectos recompensantes de la cocaína [102]. En este mismo sentido, se ha descrito, que las drogas de abuso generan o modifican la fuerza sináptica en el VTA y en otras áreas del cerebro involucradas en la adicción.

1.3.1 Plasticidad en VTA y drogas de abuso

Mediante estudios electrofisiológicos se ha demostrado que la exposición a las drogas de abuso genera adaptaciones sinápticas de larga duración, similares a las formas de plasticidad que pueden ser inducidos por protocolos *in vitro* (Potenciación a largo plazo o LTP) [103]. La exposición a las drogas de abuso *in vivo* es suficiente para provocar adaptaciones en las sinapsis excitatorias en las neuronas DA del VTA. Se ha observado que veinticuatro horas después de la inyección de distintas drogas se detecta un fortalecimiento de la transmisión mediada por el receptor de glutamato del tipo AMPA [104, 105]. Este fenómeno se observa con inyección aguda de cocaína, anfetamina, nicotina, morfina y etanol. Además se ha descrito que el entrenamiento con recompensantes genera un aumento en las corrientes excitatorias en el VTA. Este aumento se mantiene en el tiempo pese a que la administración del

recompensante haya cesado (Figura 4). Es interesante notar, que este aumento en las corrientes excitatorias es de mayor duración si se ha administrado una droga de abuso. Se ha registrado una potenciación que dura por más de 3 meses después de la administración de cocaína. En cambio, con la administración de recompensantes naturales, la potenciación dura hasta 3 semanas post entrenamiento [106] (Figura 4).

Además se ha descrito que no solo se potencia la sinapsis excitatoria por la administración de drogas de abuso, sino que también se ha descrito que anfetamina bloquea la inducción de la depresión a largo plazo (LTD) en las sinapsis del VTA [107] y bloquea los potenciales postsinápticos inhibitorios inducidos por los receptores de glutamato metabotrópicos [108]. Todas esas observaciones muestran que las drogas de abuso, generan un estado de excitación aumentado en VTA.

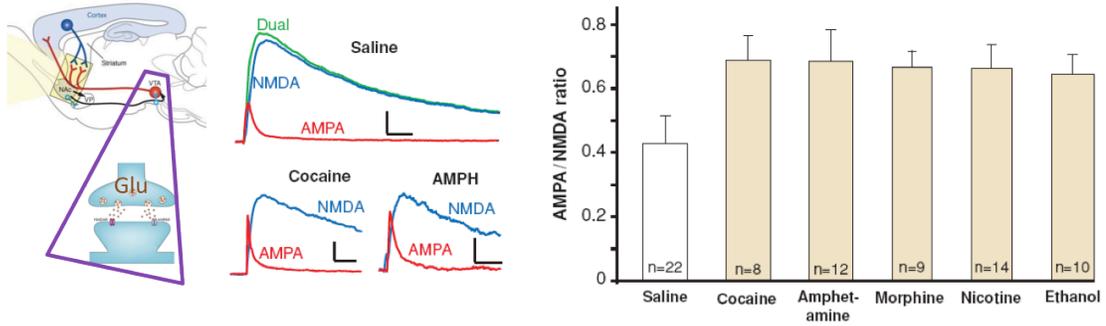
1.3.2 Cambios moleculares inducidos por drogas de abuso en el circuito de la motivación

A nivel molecular, la estimulación de los receptores de dopamina en múltiples regiones del cerebro, promueve la activación del factor de transcripción CREB y la inducción de la transcripción de múltiples genes [109]. Ejemplos incluyen Homer-1a, NARP, arc, y muchos otros [110]. Además se ha descrito que dentro de los genes que se inducen en respuesta a dopamina se encuentran muchos factores de transcripción. Esto puede llevar a la alteración de la expresión de genes blanco específicos. Es así que se ha descrito la inducción de c-fos, Fras, JunB, y zif268 en respuesta a DA [111, 112] lo que a su vez puede afectar tanto las adaptaciones homeostáticas como el aprendizaje asociativo [110]. Se ha demostrado que el factor CREB regula la transcripción de Δ FosB, una isoforma truncada de FosB, que tiene una

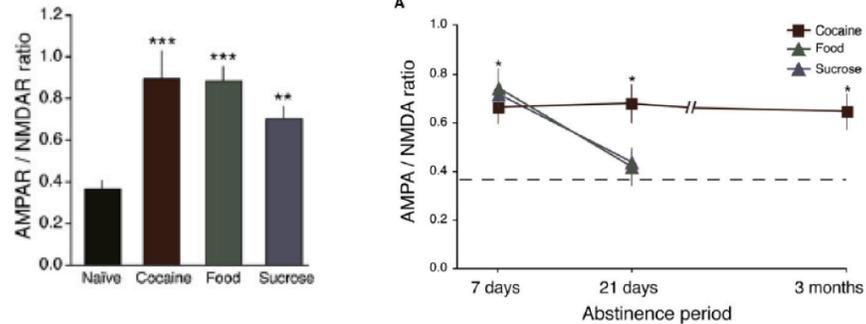
vida media larga en comparación con todos los otros miembros de la familia de factores de transcripción Fos. Esta isoforma al ser de larga vida, comienza a acumularse con la estimulación repetida del circuito por acción del uso repetido de drogas de abuso. Se ha demostrado que a largo plazo, la administración de distintas drogas de abuso como cocaína, anfetaminas y opiáceos, induce Δ FosB en el NAcc y en el cuerpo estriado dorsal. Esta acumulación de Δ FosB persiste durante semanas, incluso después de que el consumo de drogas ha sido descontinuado [113].

FIGURA 4

A



B

**Figura 4: Efecto de recompensantes sobre la transmisión glutamatérgica en el VTA.**

A Derecha: esquema de los registros de las corrientes excitatorias post-sinápticas obtenidas en rebanadas del VTA. Izquierda: Efecto de una única dosis de diferentes drogas de abuso sobre la corrientes excitatorias representadas como la razón AMPA/NMDA (*Modificado de Ungless y cols. Nature 2001 [105]*). B Cambios en las corrientes excitatorias debido al entrenamiento con recompensantes (Naturales: comida y sacarosa y Droga de abuso: cocaína) Izquierda: ejemplo del cambio en las razones AMPA/NMDA debido al entrenamiento. Derecha: cambio en el tiempo en la razón AMPA/NMDA post entrenamiento (*Modificado de Chen y Cols., Neuron, 2008 [106]*)

1.4 APRENDIZAJE Y MEMORIA

1.4.1 Plasticidad en memoria asociativa

Los cambios plásticos de tipo LTP y LTD corresponden a cambios en la fuerza sináptica que son a la vez, asociativos y sinapsis específico. Se ha postulado que los mecanismos detrás de estas formas de plasticidad desempeñan papeles críticos en los cambios dependientes de la experiencia, incluyendo el aprendizaje y la memoria [63, 114].

Es así, que hoy en día es ampliamente aceptado que los cambios plásticos tipo LTP son la base celular de la memoria a largo plazo. La memoria a diferencia de la mayoría de las adaptaciones homeostáticas, puede durar muchos años o incluso toda la vida.

1.4.2 Papel de la proteína quinasa M ζ en aprendizaje y memoria.

Trabajos en distintas formas de plasticidad han sugerido que existen mecanismos moleculares y celulares comunes que subyacen a la plasticidad. En el hipocampo se ha demostrado que la isoforma de PKC ζ atípica, PKM ζ es necesaria y suficiente para la mantención del LTP inducido en sinapsis excitatorias de rebanadas de hipocampo [115].

La inhibición farmacológica de esta quinasa anula la fase de mantención del LTP y la administración de PKM ζ exógenamente produce una potenciación de las sinapsis excitatorias en la neurona estudiada [115-117]. Más aún, la inhibición farmacológica de PKM ζ , en hipocampo *in vivo*, anula el comportamiento aprendido [118, 119]. Esta inhibición de PKM ζ

en hipocampo genera que la memoria no vuelva a expresarse, y los animales se comportan igual que lo hacían antes del entrenamiento [118].

Además, estudios en distintas áreas, han demostrado que el papel de PKM ζ no se limita al hipocampo [115, 120-123] y es así que se ha mostrado un importante papel en la memoria asociativa en la corteza insular. Este papel ha sido mostrado mediante la inhibición farmacológica de PKM ζ [124] y mediante la sobreexpresión *in vivo* de una forma dominante negativa de la quinasa [125] .

En los últimos años se ha establecido la importancia de esta quinasa en diferentes pruebas conductuales de memoria asociativa. Estudios en corteza (sensorimotora [126] y cingulada [127]), en amígdala [128-131], en NAcc [132-134] y en estriado[135] han demostrado que la inhibición de PKM ζ anula el comportamiento aprendido en distintas pruebas conductuales. Esos trabajos han demostrado que la inhibición farmacológica de PKM ζ genera una pérdida de la memoria adquirida.

Más aun, recientemente se ha demostrado la participación de PKM ζ en regiones relevantes para la señalización de la vía de inflamación y del dolor [127, 136-139].

La PKM ζ se produce por un promotor alternativo localizado en el intrón 4 del gen de la PKC ζ [140]. Debido a esto, PKM ζ carece del dominio regulatorio típico de los miembros de la familia de PKC (Figura 5). Su estructura proteica contiene sólo el dominio catalítico de la enzima por lo que ha sido considerada como una isoforma de PKC catalíticamente activa [117].

Además, PKM ζ se expresa sólo en tejido neuronal y se encuentra ausente en tejido periférico [140]. En neuronas, se ha observado que PKM ζ se expresa a nivel postsináptico, en donde participa en la mantención de la estabilidad de la sinapsis potenciada. Además, en cultivo neuronal se ha demostrado que el mensajero de PKM ζ se expresa en dendritas [141], y se ha demostrado que en ese sector neuronal, PKM ζ actúa estabilizando la proteína de andamiaje PSD95, lo que favorece la estabilidad de la espina dendrítica [142]. Además, estudios de sobre-expresión de PKM ζ en neuronas, han demostrado que PKM ζ controla la arborización dendrítica [143-145].

Estudios *in vivo* sobre el papel molecular de PKM ζ han demostrado que la inhibición de PKM ζ impide el movimiento de los receptores de glutamato de tipo AMPA a la sinapsis [120, 131], lo que es consistente con la función de esta quinasa en la potenciación de las sinapsis glutamatérgicas [115].

Consistente con esos hallazgos son los estudios *in vivo* de sobre-expresión de PKM ζ , los cuales han demostrado que un aumento en la expresión de PKM ζ permite mantener la memoria por más tiempo [125].

Al igual que los otros miembros de la familia de PKC, PKM ζ posee un sitio de fosforilación que activa la actividad catalítica de la enzima. Esta fosforilación es realizada por la enzima PDK1 [146, 147]. Se ha demostrado que PKM ζ es fosforilada en la corteza cingulada anterior en respuesta a un daño en las neuronas de la raíz del ganglio dorsal [127] y también en neuronas sensoriales por activación de la vía de señalización del factor de crecimiento neuronal (NGF) [148]. Además, se ha descrito que la expresión de PKM ζ es controlada negativamente por la enzima Pin1 [144, 149].

El papel de PKM ζ , no solo se ha estudiado en mamíferos. En otras especies, se ha demostrado un papel conservado de PKM ζ en las sinapsis y en memoria. Es así, que se ha demostrado que PKM ζ controla la sensibilización y facilitación a largo plazo en las neuronas de *Aplysia californica* [150-152]. En *drosophila melanogaster*, PKM ζ controla el comportamiento aprendido en respuesta a un estímulo oloroso [153, 154]. Debido a esto se ha propuesto que PKM ζ y sus ortólogos invertebrados juegan un papel en el mantenimiento de la memoria a largo plazo que puede haber surgido como un mecanismo especializado para la grabación de experiencias dentro de los circuitos neuronales de una manera que es estable durante meses, pero reversible a medida que surjan nuevas necesidades. Lo cual podría ser un mecanismo útil para la supervivencia de los animales que se ha mantenido durante cientos de millones de años [153].

FIGURA 5

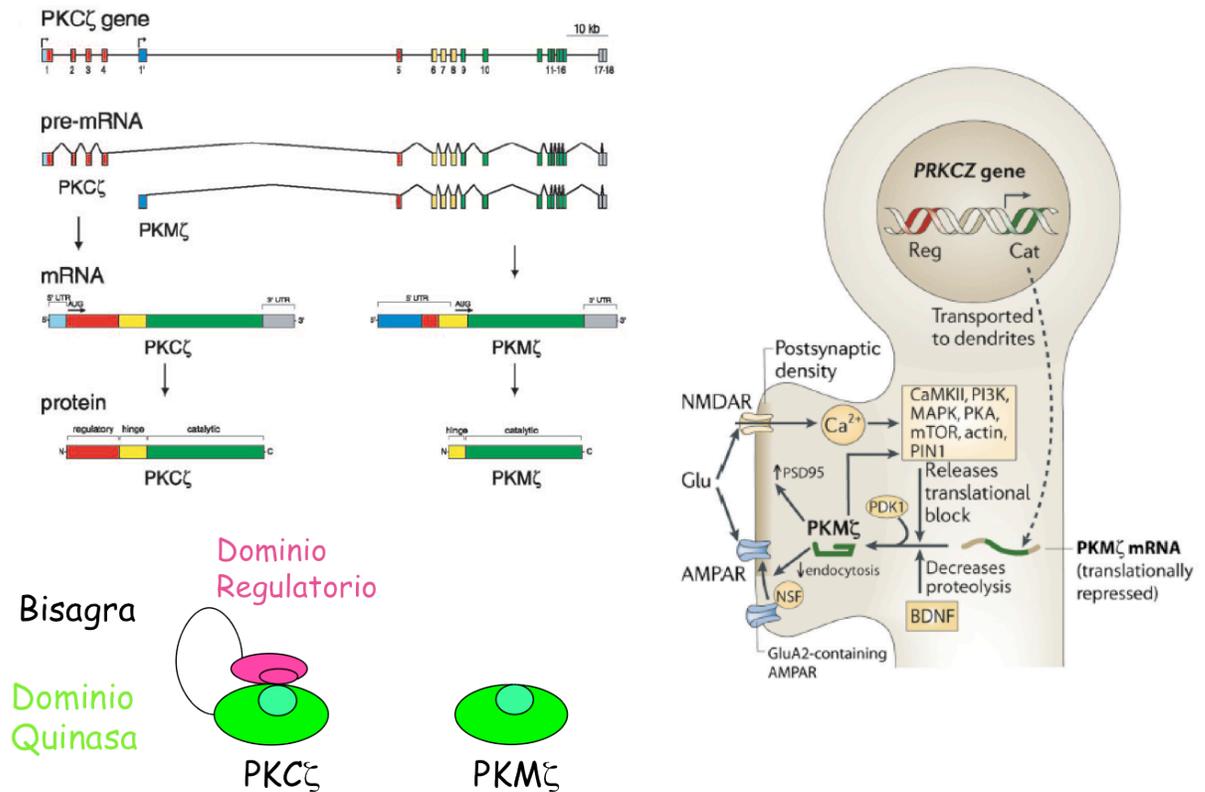


Figura 5: Organización del gen de PKC ζ y comparación entre PKC ζ y PKM ζ . Izquierda: Organización del gen de PKC ζ . Se muestran los dos mRNA producidos por transcripción de este gen. (Tomado de Hernández y cols; *JBC*, 2003 [140]). Derecha: Modelo propuesto para la síntesis de PKM ζ en sinapsis excitatorias (Tomado de Sacktor *Molecular Brain*, 2012 [153])

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis consistió en investigar el papel de la proteína quinasa, PKM ζ , en los cambios inducidos por psicoestimulantes en el área del VTA. Para ello la hipótesis de trabajo propuesta fue que:

“LA INDUCCIÓN DE PKM ζ EN EL ÁREA DEL VTA DETERMINA LA MANTENCIÓN DE LA MEMORIA ASOCIATIVA INDUCIDA POR PSICOESTIMULANTES”

Para comprobar esta hipótesis se propusieron 2 objetivos específicos que se detallan a continuación.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Evaluar la expresión de PKM ζ en el VTA de ratas tratadas con anfetamina.

Para ello se propusieron 2 sub-objetivos:

1.1 *Caracterizar la expresión de PKM ζ en el VTA.* Como hasta la fecha no se ha caracterizado la expresión de PKM ζ en VTA de rata, decidimos estudiar la expresión y distribución de PKM ζ en las distintas sub-regiones del VTA. Y, además, evaluar el fenotipo neuronal de las células que expresan PKM ζ .

1.2 Determinar la inducción de PKM ζ en el VTA de ratas tratadas con anfetamina. Para poder estudiar el papel de PKM ζ en las conductas motivadas, decidimos estudiar cambios en la expresión de PKM ζ en el VTA de ratas tratadas con anfetamina. Se evaluaron cambios a nivel del mensajero: luego del entrenamiento con anfetamina y durante el entrenamiento. También, se evaluaron cambios en los niveles proteicos de PKM ζ luego del entrenamiento.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Determinar si la actividad de PKM ζ es necesaria para la búsqueda de droga.

Para poder determinar si la actividad de PKM ζ esta siendo modulada por el tratamiento con anfetamina se decidió utilizar distintas estrategias experimentales para determinar su actividad: se determinó el estado de la fosforilación en el sitio activante de la quinasa. Se midió la actividad quinasa *in vitro* y se evaluó la actividad in vivo mediante la inhibición farmacológica de la quinasa en VTA.

2.1 Evaluar la actividad *in vitro* de PKM ζ luego del tratamiento con anfetamina. Para ello se utilizaron lisados de proteínas de VTA de ratas tratadas con anfetamina y se determinó el grado de fosforilación de PKM ζ , lo cual corresponde a una medida indirecta de la actividad de la quinasa. Y como aproximación complementaria se decidió realizar ensayos de actividad quinasa *in vitro* en muestras de VTA.

2.2 Evaluar si PKM ζ participa en la búsqueda de droga.

2.2.1 Evaluar si la inhibición de PKM ζ altera la conducta de búsqueda de droga.

Para ello a las ratas entrenadas con anfetamina se les infundió directamente el inhibidor de PKM ζ en VTA. La conducta de búsqueda de droga se evaluó posterior a la inhibición.

2.2.2 Evaluar si la actividad de PKM ζ es necesaria para mantener los cambios a largo plazo. Para ello, se realizaron dos tipos de aproximaciones experimentales. Primero se evaluó si a las ratas infundidas con el inhibidor de PKM ζ inmediatamente post-test mantenían el efecto luego de una semana post inhibición. Y segundo, se decidió evaluar la inhibición de PKM ζ luego de un periodo de abstinencia, donde se ha descrito que los cambios plásticos ya han sido instalados. Para ellos se utilizó un periodo de abstinencia de 5 semanas luego del entrenamiento con anfetamina y se infundió el inhibidor de PKM ζ , la conducta de búsqueda de droga se evaluó posterior a la infusión del inhibidor.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Los materiales para la cirugía estereotáxica de implantación de cánula guía se obtuvieron de Plastic one (Virginia, USA) y de Harvard Apparatus (Massachusetts, USA). El cemento dental para la fijación de los tornillos se obtuvo de productos dentales Marche (Santiago, Chile).

Ketoprofeno 1% inyectable se obtuvo de Sanofi y el antibiótico Floxagen (enrofloxacino 5%) inyectable se obtuvo de Chemie (Santiago, Chile).

Anfetamina Sulfato se obtuvo por donación de Laboratorio Chile S.A (Santiago, Chile).

Para el análisis de expresión del mensajero se utilizaron reactivos libres de DNAsa/RNAsa.

Para la extracción de RNA se utilizó TRIZOL de invitrogen (Massachusetts, USA). Los solventes: cloroformo, isopropanol y etanol puro se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El agua ultra pura se obtuvo de IDT (Iowa, USA).

Para los estudios de PCR cuantitativo todos los reactivos utilizados se obtuvieron de Roche (Bavaria, Alemania).

Tanto las sondas para la hibridización *in situ* como los partidores para las reacciones de PCR se sintetizaron en IDT.

Para los estudios de expresión de proteínas, todos los anticuerpos anti PKC ζ se obtuvieron de Santa Cruz biotechnology (Texas, USA). Los anticuerpos anti TH, anti GADPH, anti α -tubulina y anti glutámico descarboxilasa se obtuvieron de Millipore (Massachusetts, USA). El anticuerpo anti serina-treonina se obtuvo de ABCAM (Cambridge, Inglaterra). Todos los anticuerpos secundarios se obtuvieron de Jackson ImmunoResearch (Philadelphia, USA).

Tanto el equipo como los reactivos para el Western Blot fueron obtenidos de BIO-RAD (California, USA). La inmunoprecipitación se realizó con reactivos obtenidos de eBioscience (California, USA). Los reactivos SDS, Tris-OH, SSC y sacarosa fueron obtenidos de Winkler (Santiago, Chile). Los reactivos BSA, Glicina, 2-mercaptoetanol y paraformaldehído, fueron obtenidos de Sigma (Missouri, USA).

El ensayo de actividad quinasa “Peptag Non-radioactive protein kinase assay” se obtuvo de Promega (Wisconsin, USA). Los ensayos de determinación de proteínas (BCA) y de detección de quimioluminiscencia (super signal west pico) se obtuvieron de Pierce, Thermo (Illinois, USA).

MÉTODOS

Animales y cirugía:

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de peso inicial entre 250-280g. Las ratas se mantuvieron en una habitación climatizada a 22 ± 1 °C y con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas. Las ratas dispusieron de alimento y agua “*ad libitum*” hasta el momento del experimento. Las ratas fueron manipuladas de acuerdo a las normas establecidas para el cuidado de animales de la Facultad de Ciencias Biológicas, PUC. El protocolo de manejo de animales fue aprobado por el comité de bioética y bioseguridad de la Facultad en noviembre del 2008.

Para la cirugía estereotáxica, las ratas se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de hidrato cloral (400 mg/kg) y se colocaron en el aparato estereotáxico (Stoelting) para implantación de la cánula guía de inyección (26 GA, 11 mm; Plastics one) o de la cánula guía

de microdiálisis (CMA 12 Guide Cannula; Harvard Apparatus). La cánula se cementó al cráneo mediante fijación con tornillos de 1mm de profundidad (Plastics one).

Luego de la cirugía se le administró a cada rata, como medida profiláctica, el antibiótico enrofloxacino 5% (10mg/Kg i.p) y el anti-inflamatorio ketoprofeno 1% (0,2 mg/Kg i.p.) por tres días. Se permitió una semana de recuperación antes de iniciar los experimentos.

Las cánulas guías se posicionaron bilateralmente en el VTA según el Atlas de Paxinos y Watson [155] utilizando las siguientes coordenadas: cánula guía de inyección en VTA: 5,2mm posterior a bregma, 2,2mm laterales en un ángulo de 12° y 6,7mm dorso-ventral. Las cánulas guías fueron posicionadas 1mm por sobre el sitio de infusión. Las cánulas guía para sondas de microdiálisis se posicionaron en el NAcc de uno u otro hemisferio, utilizando las siguientes coordenadas NAcc: 1,2mm anterior a bregma, 1,6mm laterales y 5,6mm dorso-ventral. Las cánulas guías de microdiálisis se posicionaron 2mm por sobre el NAcc.

Al finalizar los experimentos, los animales se sacrificaron vía infusión intracardiaca de 4% paraformaldehído y se verificó la posición de la cánula mediante tinción de Nissl en cortes congelados de 50µm obtenidos con criostato (Leyca).

Microdissección del VTA.

Las ratas se sacrificaron rápidamente por decapitación, el cerebro fue removido y colocado en solución salina estéril fría. Mediante el uso de un molde de cerebro se obtuvo un corte coronal a la altura del VTA, aproximadamente desde -4,5 a -5,8mm posterior a bregma [155] El VTA se microdisectó bilateralmente con un sacabocado de 2mm de diámetro.

PCR y qPCR.

Luego de la disección bilateral del VTA, se extrajo RNA de cada muestra, utilizando TRIZOL (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. El RNA precipitado se resuspendió en aproximadamente 15 μ l de agua ultra pura (IDT). Posterior a la extracción de RNA, y para eliminar el DNA genómico residual, las muestras se trataron con DNAsa I (Ambion life technologies) según el protocolo del fabricante. El RNA suspendido se guardó a -80°C hasta su análisis. Los mRNA fueron convertidos a cDNA utilizando oligodT como partidor y la enzima transcriptasa reversa MMuLV (Fermentas). Para la reacción, se utilizaron 0,5 μ g de RNA de cada muestra y la reacción se llevó a cabo por 1hr a 37°C . La reacción se detuvo por calentamiento a 70°C por 5 min. El cDNA obtenido se guardó a -20°C hasta su uso.

Se realizó la reacción de PCR utilizando partidores que reconocen específicamente a PKM ζ . Estos partidores reconocen la secuencia localizada en la región 5' UTR de PKM ζ ausente en PKC ζ [140]. Para el análisis de expresión por PCR convencional se utilizó las siguientes condiciones de reacción: 5 minutos de desnaturación inicial a 94°C , seguido por 30 ciclos de amplificación (94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos) y luego extensión final de 10 minutos a 72°C . Como control se utilizó la amplificación del transcrito de ciclofilina, como se ha descrito previamente [156, 157].

Para las determinaciones cuantitativas primero se analizó la integridad de las muestras de RNA obtenidas, mediante geles de agarosa al 1% y tinción con Syber Green (Invitrogen, life technologies). Las muestras de RNA se observaron a la luz UV para visualizar las bandas de rRNA 28s y 18s similar a los reportado previamente [158]. Aquellas muestras que mostraron

algún grado de degradación fueron descartadas del análisis por qPCR. Para la reacción de qPCR se utilizó el equipo LightCycler (Roche). Además de la visualización del RNA por UV, todas las muestras se revisaron realizando un PCR convencional para amplificar el transcrito de ciclofilina antes de ser analizadas por qPCR.

Tanto para PCR como qPCR se utilizaron los siguientes pares de partidores:

PKM ζ F: 5'-CCT TCT ATT AGA TGC CTG CTC TCC-3',

PKM ζ R: 5'-TGA AGG AAG GTC TAC ACC ATC GTT C-3';

PKC ζ F: 5'-CCA TGC CCA GCA GGA CCG-3';

CYC F: 5'-CGT GCT CTG AGC ACT GGG GAG AAA-3',

CYC R: 5'-CAT GCC TTC TTT CAC CTT CCC AAA GAC-3'

La reacción de qPCR se estandarizó experimentalmente y las condiciones óptimas de amplificación correspondieron a 3mM de MgCl₂ y 1/10 de cDNA.

Para calcular la expresión relativa de cada transcrito se utilizó el método del Ct comparativo reportado previamente [159], pero con modificaciones, este método asume que la amplificación se duplica en cada ciclo, para nuestras mediciones se decidió determinar experimentalmente el comportamiento de cada reacción de PCR de acuerdo a nuestras condiciones experimentales. Para ello, se decidió utilizar el cálculo de la eficiencia (E) de cada amplicón en la reacción de qPCR, como se ha demostrado previamente [160]. La eficiencia (E) se obtuvo del inverso de la pendiente de la recta que se obtiene al graficar los “crossing points” (Cp o Ct) vs log[cDNA] (Figura 6). La E obtenida para nuestras condiciones experimentales fue de $E_{cyc} = 1,69$ para ciclofilina y $E_{PKM\zeta} = 1,59$ para PKM ζ .

Para realizar el análisis de la expresión de los transcritos, se utilizaron los Cp entregados en la corrida de qPCR y se calculó la expresión relativa de cada transcrito mediante el cálculo de E^{Cp} . La expresión de PKM ζ se normalizó con lo obtenido para ciclofilina, mediante el siguiente calculo: $E_{PKM\zeta}^{CpPKM\zeta} / E_{Cyc}^{CpCyc}$. Los valores obtenidos se graficaron y se analizaron estadísticamente.

FIGURA 6

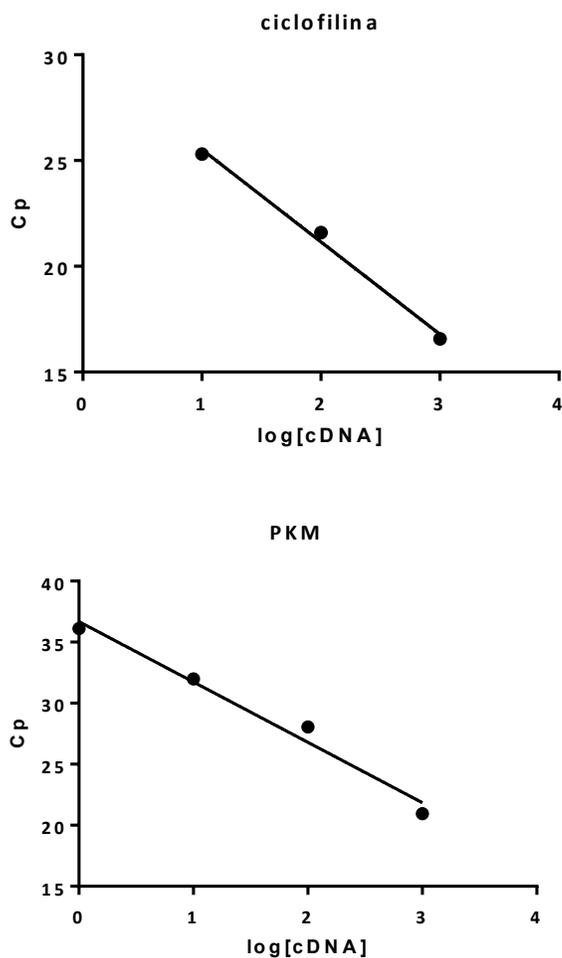


Figura 6. Curvas de eficiencia de la amplificación por qPCR de ciclofilina y PKM ζ .

Gráfico de los “Crossing points” (Cp) obtenidos a distintas cantidades de cDNA (expresado en log). La pendiente del gráfico se utilizó para obtener la eficiencia de cada amplicón como se detalla en métodos.

Western Blot e inmunoprecipitación.

Los VTA disectados de 2 ratas se homogenizaron en buffer de lisis RIPA con tritón x-100 (Millipore) e inhibidores de proteasas (Complete mini, Roche). Para la homogenización se utilizó ruptura por sonicación utilizando un sonicador de vástago. Los restos de células sin romper y membranas fueron eliminados mediante centrifugación en frío a 12000g. El sobrenadante se recuperó y la concentración de proteínas se determinó usando el ensayo de ácido bicinonínico (BCA), utilizando una curva estándar de albumina de suero de bovino (BSA).

Para realizar el western blot, se mezclaron 100µg de proteínas con buffer de carga de Laemmli 4x y se resolvieron en geles de poliacrilamida con SDS 10%. Las proteínas separadas por tamaño se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0,2 µm, BIO-RAD) por 1,5hr con corriente de 300mA. El bloqueo de la membrana se realizó con 5% leche descremada en PBS o 3% BSA en PBS por 2 h a temperatura ambiente. Luego del bloqueo, las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos: anti PKCζ c-terminal (H-1) 1:1000; Anti Fosfo PKCζ (t-410) 1:100; anti TH 1:10000, anti GADPH 1:10000, anti α-tubulina 1:10000 por toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron reconocidos con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a HRP 1:4000 en PBS. La actividad de la enzima HRP se detectó utilizando quimioluminiscencia con el kit super signal West pico. La quimioluminiscencia producida se detectó utilizando un film fotográfico (Kodak) y las bandas inmunoreactivas fueron analizadas por escaneo densitométrico utilizando el software image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

Para la detección de las formas fosforiladas y para los ensayos de actividad quinasa *in vitro* se debió inmunoprecipitar las muestras. Para ello, 500 µg de lisado total del VTA (equivalente a 3-4 ratas) se incubaron con 25 µl de esferas de agarosa (TrueBlot, eBioscience) por 1h. Luego se centrifugó a 1000g y las esferas se descartaron. El sobrenadante se incubó con los anticuerpos anti PKCζ (25 µg, c-20) o anti fosfo-serina-treonina 1:100. La incubación se realizó por toda la noche a 4°C.

Posteriormente se agregó 25 µl de las esferas de agarosa y se incubó nuevamente a 4°C por 1 hr. Los inmunoprecipitados se recuperaron centrifugando a 10000g por 3 minutos, y luego de los lavados con RIPA 1X, se resuspendieron en buffer de carga de Laemmli. Los inmunoprecipitados fueron luego sometidos a western blot o ensayo de actividad como se describe a continuación.

Actividad de PKC/PKM ζ in vitro.

Se inmunoprecipitaron lisados totales de proteínas del VTA de ratas entrenadas con amfetamina y de sus controles con salino, como se describió anteriormente. Las quinasas inmovilizadas en las esferas de agarosa fueron sometidas al ensayo de actividad quinasa *in vitro* utilizando las recomendaciones del fabricante. Se utilizó el volumen de reacción recomendado (25µl) y un tiempo de reacción de 30 min, que asegura la linealidad en la cuantificación de la reacción enzimática.

Este ensayo utiliza un péptido sintético fluorescente para la determinación de la actividad quinasa *in vitro*. La secuencia de aminoácidos del péptido es P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K, el cual presenta una única serina fosforilable por los miembros de la familia PKC. Transcurrido los 30 minutos la reacción se detuvo calentando la solución a 95°C por 10 minutos. El péptido

fosforilado se separó electroforéticamente del no fosforilado en geles de agarosa 0,8% en solución 50 mM Tris-HCl (pH 8,0).

Utilizando la ecuación de Lambert-Beer se determinó la absorptividad molar (ϵ) en las condiciones experimentales, la cual correspondió a $17270,4 \text{ L/mol cm}^{-1}$. Mediante la medición de la absorbancia a 570nm de la banda correspondiente al péptido fosforilado se determinó el número de moles de péptido que es fosforilado en presencia de la muestra. Debido a que existe sólo un sitio de fosforilación en cada péptido, los moles de péptido presente en la banda fosforilada corresponden al número de moles de fosfato transferidos en la reacción. La determinación de los moles se utilizó para el cálculo de la actividad quinasa, que corresponde al número de nanomoles de fosfato transferido a un sustrato por minuto por mililitro.

Hibridización in situ.

Para determinar la expresión de PKM ζ en tejido, se realizó hibridización *in situ* no isotópica como se ha descrito previamente [161]. Los animales se perfundieron vía infusión intracardiaca de 500ml de una solución 4% paraformaldehído. Posteriormente se permitió un tiempo de post-fijación de 30 min en 4% paraformaldehido. Luego los cerebros se mantuvieron en solución de sacarosa 20% en agua ultra pura por 48 hrs. Posteriormente, se realizaron cortes coronales y horizontales de cerebro medio que comprenden la región del VTA utilizando un criostato (Leica). Los cortes se recibieron en PBS en placas de 24 pocillos estériles. Luego de los lavados con PBS, se realizó la prehibridización en buffer de prehibridización (10mL de SSC 20x, 1mL Denhart 50X y 39mL de agua ultra pura) durante 30 minutos a 65°C con agitación. La hibridización se realizó con buffer de hibridación (0,5mL Formamida, 10 μ L DTT100mM, 0,28mL agua ultra pura) que contiene la sonda contra PKM ζ

(100pmol/ml) durante 16 horas con agitación. Se utilizó una sonda nucleotídica dirigida contra el 5'UTR específico de PKM ζ , con la siguiente secuencia: 5'CAT CTA ATA GAA GGT TGA CTG TCC TGC TCC CCG CCT CTC-3'. La sonda marcada en su extremo 3' con digoxigenina (DIG) se detectó con anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (Roche). Como control, se utilizó la incubación con exceso de sonda no marcada. Se determinó experimentalmente una temperatura de 38°C para esta sonda.

Para los experimentos de hibridación *in situ* fluorescente se sintetizó la secuencia de la sonda acoplada al fluoróforo CY3 en el 3' de la sonda (IDT). Inmediatamente después del protocolo de Hibridación *in situ* fluorescente, los cortes coronales de cerebro medio se sometieron a inmunohistoquímica para detectar la inmunoreactividad de la enzima tiroxina hidroxilasa 1:200 y/o glutámico descarboxilasa 1:100, enzimas claves en la síntesis de dopamina y del ácido γ -amino butírico, respectivamente. La hibridación *in situ* acoplada a inmunofluorescencia se visualizó mediante microscopía confocal.

Prueba de Preferencia de lugar inducida por Anfetamina.

Para evaluar el comportamiento tipo adictivo se utilizó el paradigma de preferencia de lugar condicionado o CPP. La base de este modelo consiste en que el animal pasa más tiempo en el compartimiento en el cual recibió la inyección de la droga. Este aumento en el tiempo en el compartimiento pareado a la droga sugiere efectos de refuerzo positivo [162].

El aparato de CPP está formado por dos compartimientos distintos, uno negro con piso liso y el otro blanco con piso con textura. Ambos compartimientos se encuentran separados por un pasillo (compartimiento neutral). Se siguió un protocolo de entrenamiento con anfetamina con ciertas modificaciones a lo reportado anteriormente [163]. Brevemente, antes de comenzar el

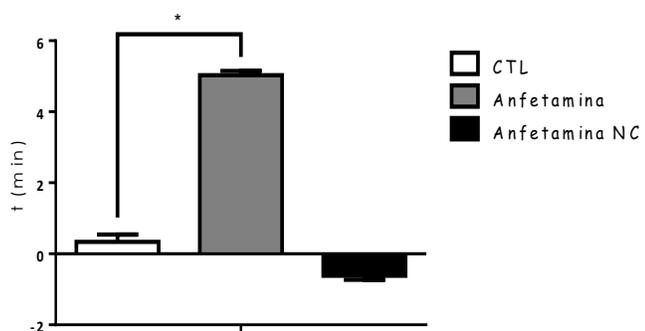
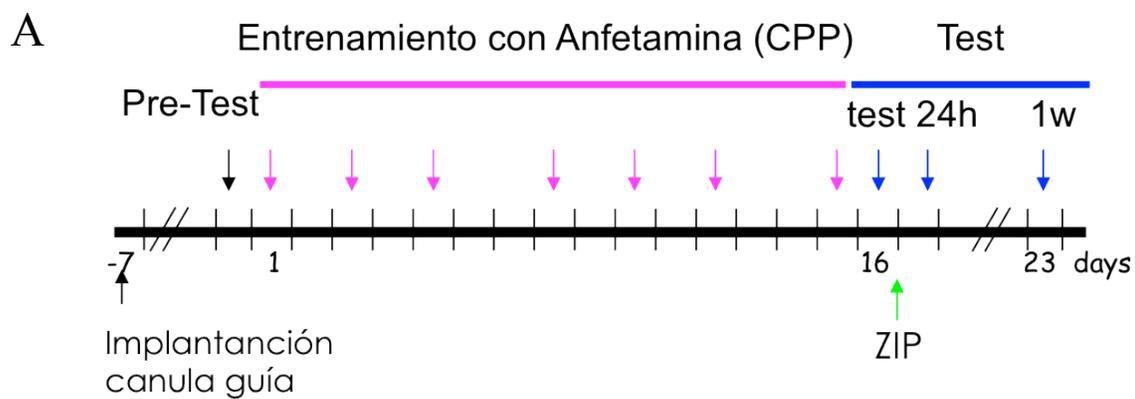
entrenamiento con anfetamina, se midió la preferencia natural del animal por los distintos compartimentos. Para ello, las ratas se dejaron en el pasillo central y se les permitió la libre exploración por 15 min (Pre test). El tiempo de permanencia en cada compartimiento fue registrado. Posteriormente, el periodo de entrenamiento consistió en inyectar anfetamina (1,5 mg/Kg, Laboratorio Chile) o salino i.p. y dejar al animal en el compartimiento no preferido por 40 minutos sin posibilidad de exploración hacia los otros compartimentos. El entrenamiento con anfetamina se efectuó día por medio por 2 semanas. Todas las inyecciones se realizaron entre las 9 am y 2pm. La última inyección de anfetamina se administró el día 15 de entrenamiento y al día siguiente se realizó la prueba de CPP (test), que consistió en registrar el tiempo que el animal pasa en el compartimiento asociado a anfetamina. Los datos obtenidos de cada rata se expresaron como la diferencia entre el tiempo que pasa después del entrenamiento menos el que paso antes del entrenamiento (Δt).

Nuestro protocolo de entrenamiento con anfetamina mostró que alrededor de un 70-75% de las ratas que recibieron anfetamina adquirieron el criterio de condicionamiento (figura 7A). El criterio de condicionamiento se fijó empíricamente estableciéndose un umbral de 2 min de Δt , aquellas ratas que recibieron anfetamina y presentaron un $\Delta t < 2$ min fueron descartadas del análisis.

Inmediatamente después del Test se realizó la extracción del VTA para el análisis de expresión o se realizó la inhibición de PKM ζ en animal despierto. Luego de la infusión del inhibidor de PKM ζ se realizó una nueva prueba de CPP a la mañana siguiente (24h). Posteriormente las ratas se dejaron sin manipulación en sus jaulas de mantención por 1 semana, tiempo después del cual se realizó nuevamente una prueba de CPP (1w) como se describió más arriba.

Para el grupo experimental de cambios a largo plazo, luego del condicionamiento con amfetamina las ratas fueron dejadas por 5 semanas sin manipulación en su caja de mantención (abstinencia). Pasadas las 5 semanas se realizó otra prueba de CPP y se realizó la extracción del VTA para los análisis de expresión de PKM ζ o los ensayos de inhibición de PKM ζ como se describió anteriormente

FIGURA 7



Total Anf	42	100%
Menos que 2 min	13	30%
Mas que 2 min	29	70%

FIGURA 7 (Continuación)

B

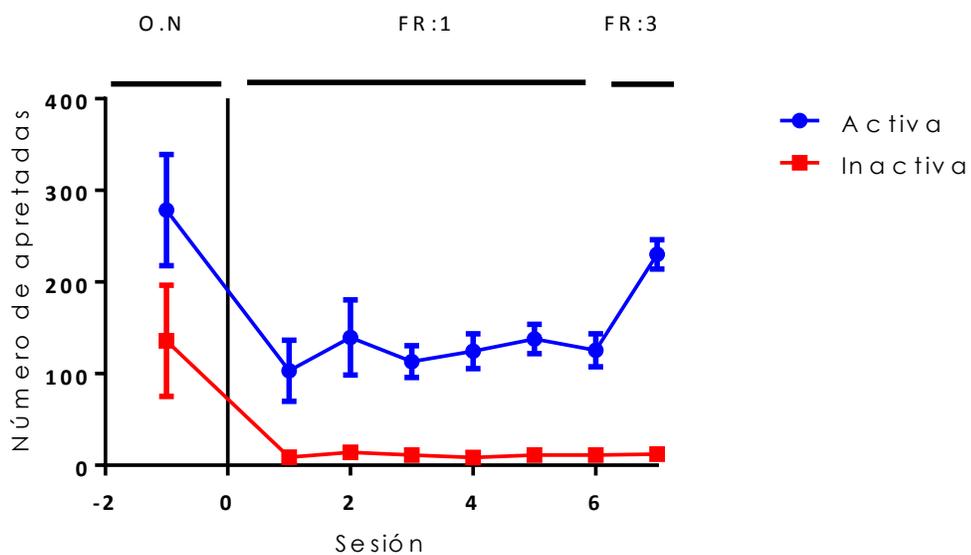
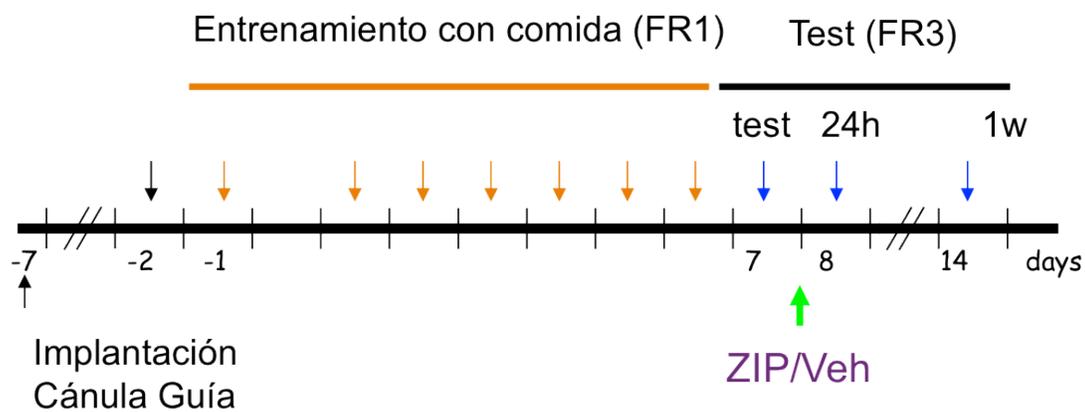


Figura 7: Protocolo de entrenamiento con recompensantes.

A) Arriba: Protocolo del entrenamiento con anfetamina en la prueba de preferencia de lugar condicionada (CPP). Flechas rosa representan las inyecciones i.p de anfetamina (1,5 mg/Kg) día por medio. Las flechas azules corresponden a las pruebas de preferencia (Test) a diferentes tiempos (*Modificado de Contreras y Cols., Science, 2007 [163]*) Abajo: se muestra un grafico de preferencia típico obtenido con este protocolo. Alrededor de un 70% de las ratas entrenadas con anfetamina presentan preferencia por el compartimento pareado a anfetamina (barra gris), mientras que un 30% no muestra preferencia (barras negras). $P < 0,05$, ANOVA 1 vía, post hoc bonferroni.

B) Arriba: Protocolo de entrenamiento con comida en autoadministración de pellets con sabor a chocolate. Las flechas naranjas representan las sesiones en las cámaras operantes por 2 horas cada día (excepto primera flecha que representa una sesión toda la noche). El entrenamiento termina luego de 7 días o cuando se adquiere un nivel de variación del 15% en tres días consecutivos (*Modificado de Chen y Cols., Neuron, 2008 [106]*) Abajo: Gráfico del número de veces que los animales aprietan la palanca en una prueba de búsqueda de comida en las cámaras operantes Azul: palanca activa, Rojo: palanca inactiva. O.N: numero de apretadas durante la sesión de toda la noche. FR:1 esquema de entrenamiento donde por cada apretada se obtiene 1 pellet. FR:3 esquema de entrenamiento donde por cada 3 apretadas se obtiene 1 pellet.

Entrenamiento con comida.

Los experimentos conductuales de entrenamiento con comida se realizaron en cámaras operantes estándar (MedAssociates). Estas cámaras cuentan con dos palancas retráctiles colocadas 5 cm sobre el nivel del suelo. Una luz blanca está ubicada 6 cm por encima de cada palanca. Las dos palancas están posicionadas a los costados de un receptáculo de alimentación.

Para el entrenamiento, una palanca se pareó con la entrega de un pellet con sabor a chocolate de 45 mg (BioServ); ésta se denominó palanca activa mientras que la otra palanca que no tenía ninguna consecuencia programada, palanca inactiva.

Después de la recuperación de la cirugía de canulación (7 días), todos los animales fueron privados de alimentos 24 horas antes de una sesión de toda la noche. Luego de esta única sesión de toda la noche se realizó el entrenamiento que consistió en sesiones diarias por 2 horas, a menos que se explicita. El entrenamiento se realizó con una razón fija de 1 apretada de palanca por pellet (FR=1). El entrenamiento se realizó por 7 días o hasta que las ratas presentaran un nivel de variación entre 3 días consecutivos no mayor a un 15% [106].

Durante el tiempo de entrenamiento las ratas van disminuyendo o mantienen bajo el número de veces que aprietan incorrectamente la palanca inactiva y estabilizan las veces que aprietan la palanca activa (Figura 7B). Luego de los días de entrenamiento se realizó una sesión de prueba (test), en la cual se fijó una razón de 3 apretadas por pellet (FR=3). Durante todo el periodo de entrenamiento el consumo de alimento en sus cajas de mantención se restringió a 15g/día.

Al grupo de ratas que recibió infusión en el VTA se le realizó un segundo test al día siguiente (24h). Luego del periodo de condicionamiento y test, las ratas se mantuvieron sin manipulación en sus jaulas de mantención con alimentación “*ad libitum*”. Luego de una semana se realizó una tercera prueba de retención (1w) en las cámaras operantes con una FR=3

Infusión de ZIP o ZIP-Scr.

ZIP (myr-SIYRRGARRWRKL-OH) y “ZIP-scrambled” (myr- RLYRKRIWRSAGR-OH) fueron obtenidos de Anaspec, (California, USA) Los péptidos liofilizados fueron resuspendidos en solución salina estéril, alicuotados y almacenados a -20°, inmediatamente post suspensión. Ambos péptidos se mantuvieron en una concentración de 10 nmol/μl. Como vehículo se utilizó una inyección de un volumen equivalente de suero salino estéril. Inmediatamente después de las pruebas conductuales se infundió directamente 1μl de ZIP o ZIP-“scrambled”, o 1 μl de vehículo bilateralmente en el VTA. La infusión se realizó con una jeringa Hamilton de 10 μl, a un flujo aproximado de 1μl/min.

Microdiálisis in vivo en animal despierto.

Para los experimentos de microdiálisis en animal despierto se utilizaron sondas de microdiálisis de 2 mm de longitud de membrana con un cutoff de 100 KDa (CMA). Luego de la implantación de la sonda, se permitió un tiempo de 1,5h para la estabilización de los niveles extracelulares de dopamina. Las ratas se mantuvieron en sus jaulas de mantención y se mantuvo un flujo constante a través de la sonda de microdiálisis con solución KRF (120 mM NaCl, 2,4mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 0,9 mM NaH₂PO₄ y 1,4 mM Na₂HPO₄, pH=7,4) a una

velocidad de 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Luego del tiempo de estabilización, las ratas se colocaron en las cámaras operantes y se realizó la recolección de las muestras cada 10 minutos en 4 μl de ácido perclórico Acético (PCA) 0,2 N con un flujo de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Luego de la semana de recuperación de la cirugía de canulación, las ratas con triple cánula se dividieron en 3 grupos: pretest, test y 24h. Al grupo pretest se le realizó la microdiálisis antes del entrenamiento con comida. El grupo test se le realizó la microdiálisis luego del entrenamiento con comida. Al grupo 24 h se le realizó la microdiálisis a la mañana siguiente de la infusión de ZIP en el VTA. La correcta postura de la sonda se confirmó como se describió anteriormente.

Las muestras recolectadas se guardaron a -20°C y luego se analizaron por HPLC para determinar los niveles extracelulares de DA.

Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

Las muestras de dializado obtenidas de la microdiálisis se analizaron usando un HPLC (BioanalyticalSystems, INC), acoplado a detección amperométrica, para la detección de DA. Como fase móvil se utilizó: NaH_2PO_4 100 mM, EDTA 1mM, ácido 1-octansulfónico 1,7 mM y Acetonitrilo (CH_3CN) 3,5% v/v ajustado a $\text{pH}=2,3$. Se utilizó una columna Sepstick microbore, a una velocidad de flujo a través de la columna de 80 $\mu\text{L}/\text{min}$. El potencial de oxidación utilizado fue de 650 mV, a una sensibilidad del equipo de 0,5 nA.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software Prism 5.0 (GraphPath). Se les realizó una prueba de ANOVA de una vía. Para determinar la significancia se realizó un análisis post-test Bonferroni, a menos que se especifique.

III. RESULTADOS

1.1. Expresión de PKM ζ en el VTA

1.1.1. PKM ζ se expresa en el VTA de rata.

Para determinar si en el VTA se expresa la proteína quinasa PKM ζ , se microdisectó la región del VTA bilateralmente siguiendo las coordenadas aproximadas de -4,5 a -5,8mm posterior a bregma, según el atlas de Paxinos y Watson [155]. Los extractos totales del VTA se analizaron por PCR y por western blot. La figura 8A muestra que en el VTA de rata se expresa el mensajero de PKM ζ y en menor medida el mensajero de PKC ζ . Como control positivo se realizó la amplificación utilizando muestras de hipocampo total de rata, donde se observa la presencia del mensajero tanto de PKC ζ como de PKM ζ . En la Figura 8B se muestra el inmunoblot de extractos de proteína total del VTA, donde se observa que PKM ζ se expresa en el VTA y también en otras áreas del circuito de la motivación como el Núcleo Accumbens y la corteza prefrontal.

Para determinar la expresión de PKM ζ en el tejido, se realizó hibridización *in situ* con una sonda diseñada para detectar solamente la expresión del mensajero de PKM ζ en cortes de cerebro medio (Figura 9A y 9C). Como control de especificidad de la técnica se realizó hibridación *in situ* en presencia de un exceso de sonda fría. La figura 9B muestra el

desplazamiento de la marca en el VTA por el exceso de sonda fría. Además se utilizó cortes de hipocampo como control positivo de la expresión de PKM ζ (Fig. 9C y 9D)

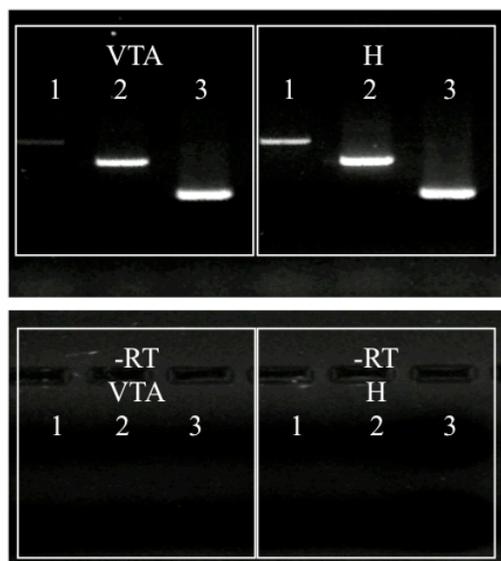
Para estudiar la distribución de PKM ζ en las diferentes subregiones del VTA se analizó la expresión del mensajero de PKM ζ mediante hibridación *in situ* en rebanadas horizontales del cerebro medio, donde se puede visualizar todas las subáreas del VTA [9]. Como se observa en la figura 9E, nuestro análisis de expresión muestra que PKM ζ se expresa en prácticamente todas las áreas del VTA, encontrando células positivas para el mRNA de PKM ζ en el área parabrachial pigmentada (PBP), en el área del parafasciculus retroflexus (PFR) y en el área paranigral (PN). Solamente se observa un menor número de células positivas para el mRNA de PKM ζ en la cola del VTA (VTT).

1.1.2. PKM ζ se expresa tanto en neuronas dopaminérgicas como en neuronas no dopaminérgicas del VTA de rata.

Para poder determinar el fenotipo de las células que expresan PKM ζ en el VTA se realizó hibridación *in situ* fluorescente acoplada a inmunofluorescencia para la enzima tirosina hidroxilasa (TH), enzima clave en la síntesis de dopamina y para la enzima glutámico descarboxilasa (GAD), enzima clave en la síntesis de GABA (no mostrado). La figura 10 muestra las micrografías tomadas con microscopía confocal de los cortes coronales de cerebro medio. Nuestros resultados muestran que el mensajero de PKM ζ se expresa tanto en neuronas dopaminérgicas del VTA (flechas anaranjadas) como también en neuronas no dopaminérgicas de esta área (flechas blancas).

FIGURA 8

A



B

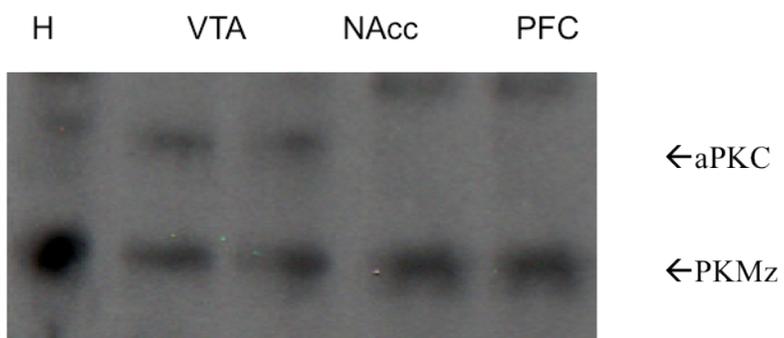


Figura 8: Expresión de PKM ζ y PKC ζ en el VTA de rata.

Análisis por PCR (**A**) y por western blot (**B**) de la expresión de PKM ζ y PKC ζ en el VTA. **A)** Amplificación por PCR de las muestras del VTA para PKC ζ (1), PKM ζ (2) y el control de carga ciclofilina (3). -RT: la reacción para generar cDNA se realizó sin la enzima transcriptasa reversa. Las bandas que se muestran corresponden a los amplificados de tamaño esperado: 480pb PKM ζ , 620 pb PKC ζ y 400 pb ciclofilina.

B Autoradiografía de un western blot utilizando el anticuerpo contra PKC ζ . Banda de ~50 KDa corresponde a PKM ζ y banda de ~75 KDa corresponde a aPKC (ζ/ι). H: Hipocampo; VTA: área del Tegmento ventral; NAcc: Núcleo Accumbens; PFC: Corteza Prefrontal.

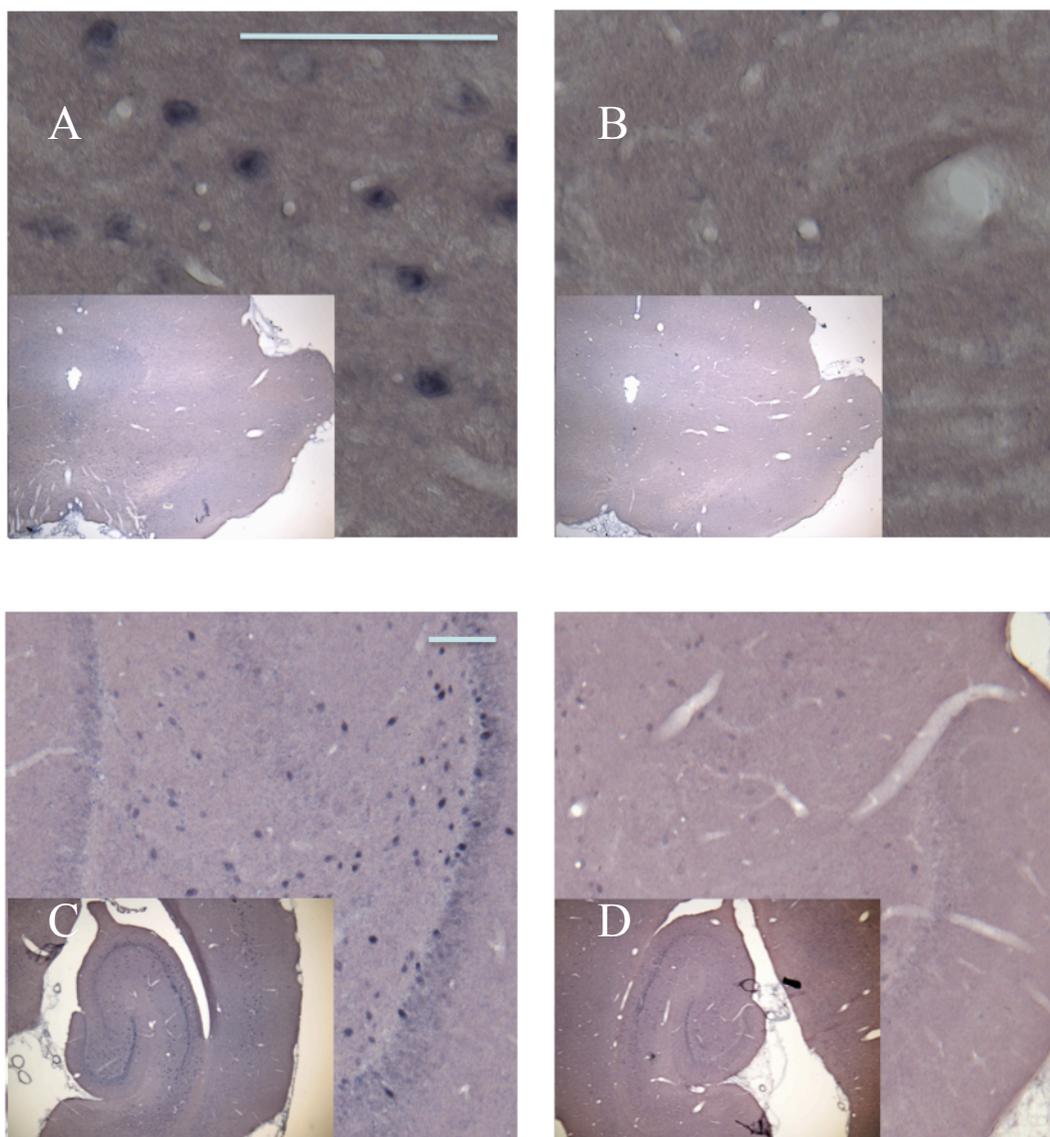
FIGURA 9

FIGURA 9 (continuación)

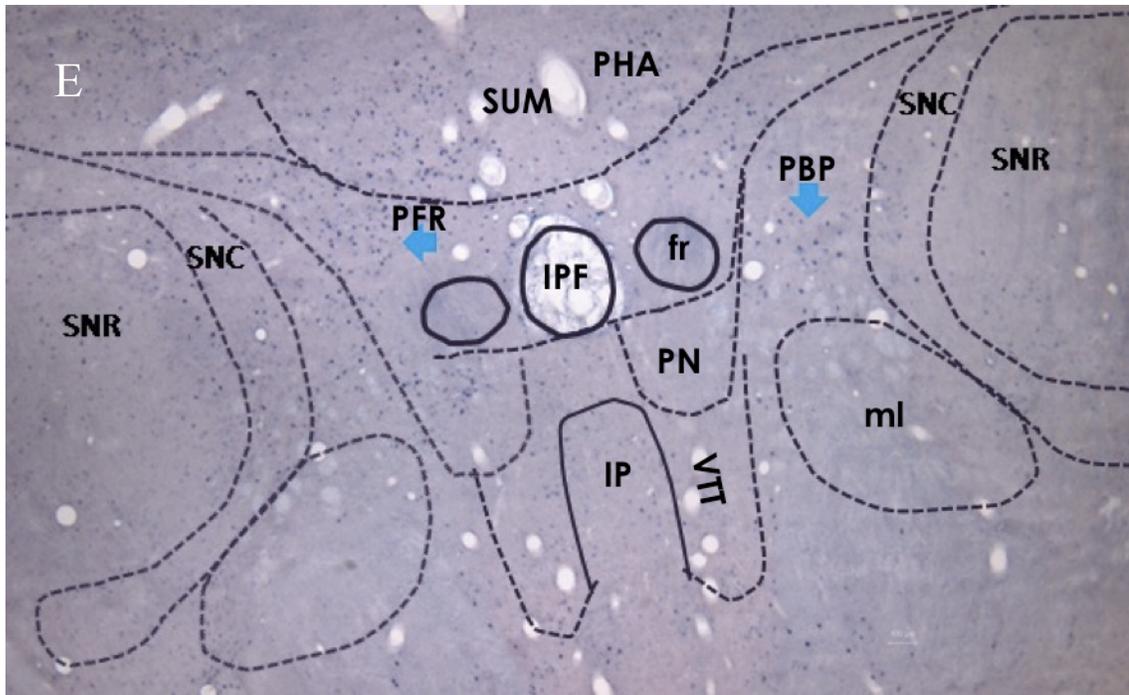


Figura 9: Caracterización de la expresión de PKMζ en el VTA de rata.

A y C: Hibridización *in situ* en cortes coronales de cerebro medio usando sonda específica dirigida a la región 5' del mensajero de PKMζ. **B y D:** Hibridización en presencia de exceso de sonda fría (200x). En **A y B** se muestra la región del VTA, en **C y D** la región del hipocampo. Las micrografías fueron tomadas con objetivo 40x. Los insertos muestran la misma región en fotografía con objetivo 4x.

E: Hibridización *in situ* en cortes horizontales de cerebro medio. Las flechas indican las zonas con marca positiva para PKMζ. Microfotografía del corte horizontal tomada con objetivo 10x. La barra corresponde a 100 μm.

FIGURA 10

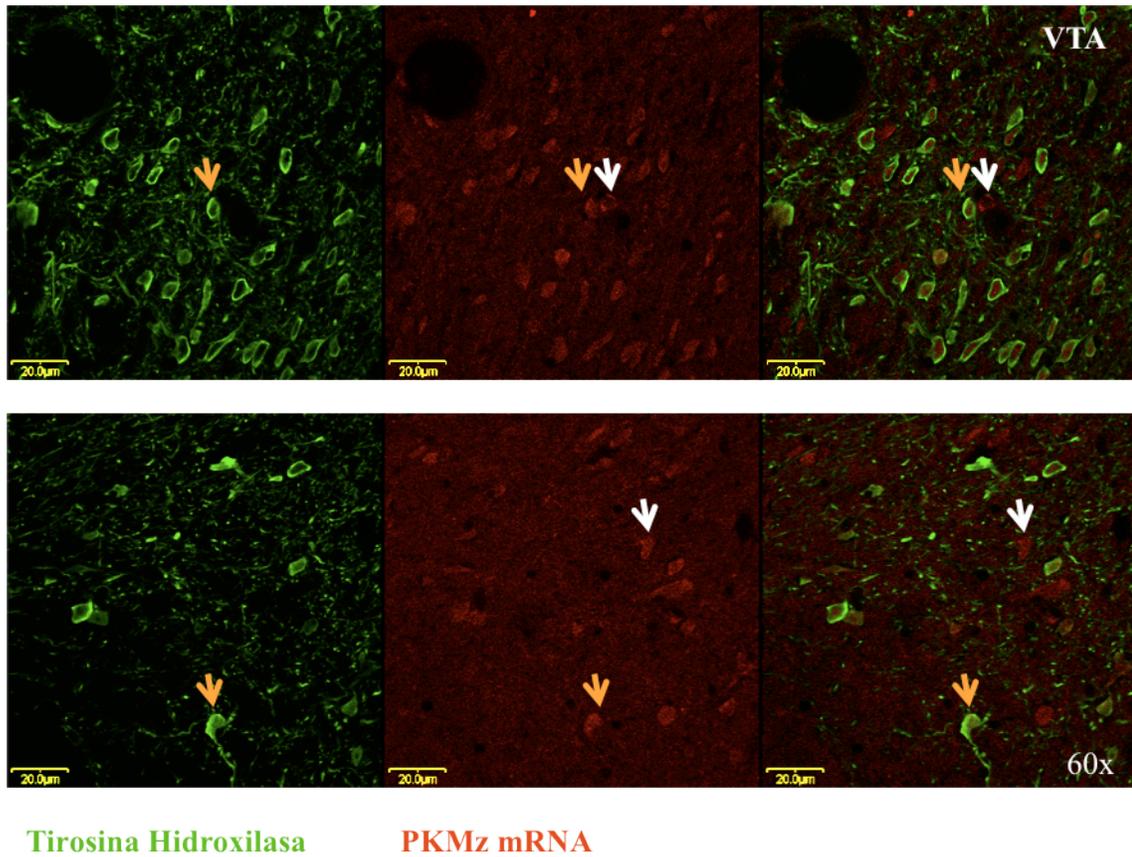


Figura 10: Caracterización del fenotipo neuronal que expresa PKMζ en el VTA de rata.

Hibridización *in situ* fluorescente contra la región 5' del mensajero de PKMζ acoplada a inmunofluorescencia contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Microfotografías obtenidas con microscopia confocal de cortes coronales de cerebro medio. Las flechas blancas muestran células del VTA positivas para PKMζ pero negativas para TH. Las flechas amarillas muestran células del VTA positivas para PKMζ y positivas para TH. Barra de tamaño 20μm. Micrografías tomadas con objetivo 60x.

1.2. Determinación de los niveles de PKM ζ en el VTA luego del entrenamiento con recompensantes.

Como ya se mencionó, el VTA es un núcleo central en los procesos neurobiológicos de aprendizaje mediado por recompensas y conductas motivadas. Para estudiar si PKM ζ tiene un papel en este tipo de aprendizaje y memoria, se decidió estudiar su expresión en distintos entrenamientos basados en recompensa. Esto debido a que se ha sugerido que PKM ζ aumenta luego del protocolo de inducción de LTP en rebanadas de hipocampo [116] y luego del entrenamiento en corteza insular [125] y como PKM ζ carece de dominio regulatorio, uno de los puntos de regulación de su actividad podría ser a través de cambios en su expresión.

Para poder determinar si la expresión de PKM ζ está siendo modulada por el aprendizaje mediado por recompensa, se estudió su expresión luego del entrenamiento con dos recompensantes distintos. Se eligió como recompensante natural la comida, y para ello se utilizó el entrenamiento con “pellets” sabor a chocolate. Como modelo de droga de abuso se utilizó D-Anfetamina, un modelo ampliamente usado en la literatura como droga de abuso.

En la figura 7 se muestra el protocolo de entrenamiento para ambos recompensantes. El protocolo experimental se detalla en métodos.

1.2.1. El mensajero de PKM ζ no cambia sus niveles luego del entrenamiento con recompensantes

Primero, los niveles de expresión del mensajero de PKM ζ se analizaron por PCR en tiempo real. Para ello, los VTA fueron extraídos inmediatamente después de finalizado el test conductual. Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 11A, dónde se muestra que la expresión del mensajero de PKM ζ se mantiene constante luego de finalizado el entrenamiento con anfetamina comparado con su respectivo control. En este mismo sentido, la cuantificación de la marca para PKM ζ por hibridización *in situ* en cortes del VTA tampoco mostró diferencias en el número de células positivas para el mensajero de PKM ζ en el VTA de ratas tratadas con anfetamina y su respectivo control con salino (no mostrado).

1.2.2. La expresión de PKM ζ no cambia luego del entrenamiento con recompensantes.

En estudios de PKM ζ en hipocampo se ha sugerido que la inducción de la potenciación podría inducir la traducción local de un mensajero de PKM ζ previamente sintetizado. Por lo tanto, para analizar si el entrenamiento con recompensantes cambia la expresión de la proteína de PKM ζ , se realizaron western blot de lisados totales de proteínas del VTA. Los VTA fueron extraídos de ratas entrenadas con anfetamina, y también se incluyó el entrenamiento con un recompensante natural como es la comida, ambos protocolos se detallan en métodos.

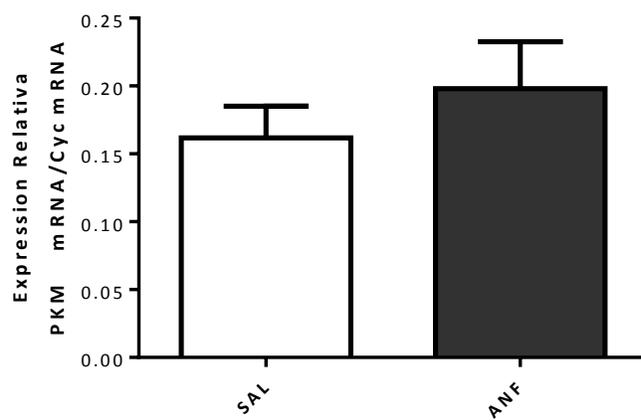
Nuestros resultados muestran que la expresión de PKM ζ se mantiene constante luego de finalizado el entrenamiento con anfetamina (barras grises) y de finalizado el entrenamiento con comida (barras negras), comparado con sus respectivos controles (Figura 11B).

1.2.3. Los niveles del mensajero de PKM ζ varían durante el entrenamiento con anfetamina pero llegan a un estado estable.

Hasta la fecha no existe un análisis de expresión de PKM ζ en entrenamientos como los estudiados en esta tesis, por lo que es posible que PKM ζ esté cambiando en algún punto durante el entrenamiento con recompensantes. Para ello, se decidió estudiar el comportamiento del mensajero de PKM ζ , durante el entrenamiento con anfetamina, realizando extracciones de VTA a tiempo cero, posterior a 1 dosis de anfetamina (24h), a la mitad del entrenamiento (día 8) e inmediatamente después de la prueba de preferencia de lugar por anfetamina (día 17). Nuestros resultados muestran que existe una fluctuación en la expresión de PKM ζ durante el entrenamiento. Encontramos que al día siguiente de una única inyección de anfetamina se produce una reducción significativa de los niveles del mensajero de PKM ζ , efecto no observado con la inyección de salino. Como se muestra en la figura 11C, esta reducción en el mensajero es reversible y ya a la mitad del condicionamiento se observa que el nivel de expresión de PKM ζ regresa al basal, logrando un nivel de expresión similar a las ratas tratadas con salino i.p.

FIGURA 11

A



B

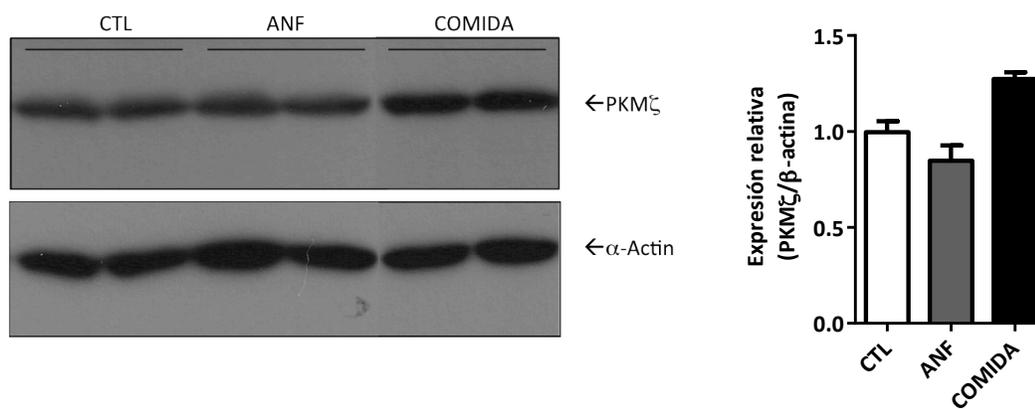


FIGURA 11 (continuación)

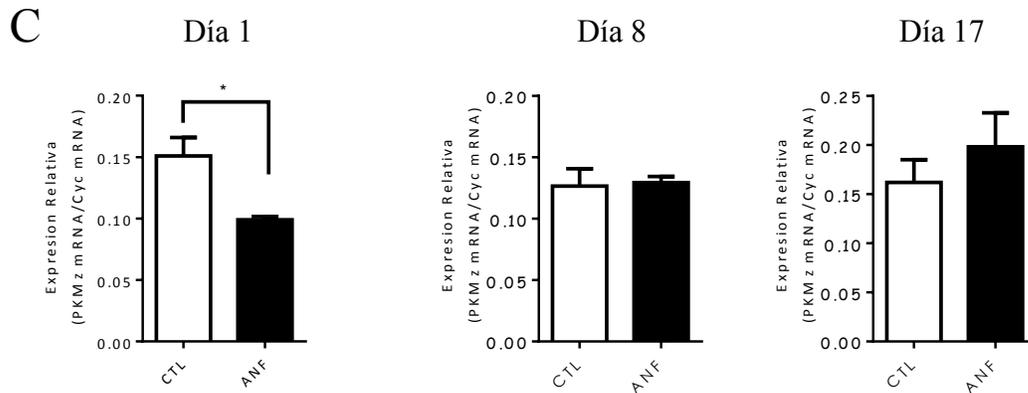


Figura 11: La expresión de PKM ζ no cambia luego del entrenamiento con recompensantes.

A. Expresión relativa del mensajero de PKM ζ en el VTA determinado por qPCR. Los valores corresponden a la expresión de PKM ζ normalizada con la expresión de ciclofilina. Los valores corresponden a la media \pm SEM.

B. Expresión de PKM ζ en el VTA determinado por western blot. Cada muestra corresponde al VTA obtenido de 2 ratas. El análisis densitométrico de las bandas se expresó relativo al control de carga β -actina. El gráfico muestra la media \pm SEM, luego del entrenamiento con anfetamina (barras grises) y luego del entrenamiento con comida (barras negras).

n=5 anfetamina, n=3 comida.

C. Expresión del mensajero de PKM ζ relativa a la expresión de ciclofilina, determinado por qPCR. La figura muestra la media \pm SEM de los datos obtenidos con tratamiento a distintos tiempos de entrenamiento con anfetamina. Tiempo 1 día, n=5, *p<0,05, tiempo 8 y 17 días n=3.

1.3. Determinación de la actividad de PKM ζ en lisado total del VTA de ratas tratadas con anfetamina.

1.3.1. PKM ζ y PKC ζ se encuentran fosforiladas en el VTA de ratas tratadas con anfetamina.

Nuestros resultados no muestran un cambio en la expresión de PKM ζ ; sin embargo, es posible que su actividad cambie por modificaciones post-traduccionales. Se ha demostrado que todos los miembros de la familia de PKC presentan un sitio de fosforilación en un residuo de treonina presente en el lazo de activación, que permite su máxima activación [164, 165]. Considerando lo anterior se decidió analizar la presencia de la fosforilación en la treonina 410 del dominio catalítico de PKM ζ . Este sitio de fosforilación se ha demostrado que activa a la quinasa y su fosforilación es catalizada por la enzima PDK1 [146, 147, 164, 165]. Para ello, se agruparon los VTA de 3 a 4 ratas tratadas con anfetamina o con salino. PKM ζ se inmunoprecipitó con un anticuerpo dirigido contra el dominio c-terminal de PKC ζ . A las muestras inmunoprecipitadas se les realizó un western blot para detectar la fosforilación en treonina 410. Como se observa en la figura 12A, el tratamiento con anfetamina aumenta la fosforilación de PKM ζ y de PKC ζ . Estos resultados sugieren que el entrenamiento con anfetamina aumenta la actividad de PKC ζ /PKM ζ .

1.3.2. La actividad de PKC ζ /PKM ζ *in vitro* muestra una tendencia de aumento en el VTA de ratas tratadas con anfetamina.

El aumento en el grado de fosforilación de PKM ζ del VTA inducido por anfetamina es una medida indirecta del aumento de su actividad. Para cuantificar este aumento en la actividad se montó el ensayo de actividad de quinasa *in vitro*. Para ello, se utilizó el kit de Promega Pep Tag Kinase assay, utilizando muestras del VTA de ratas tratadas con anfetamina y de sus controles salinos. Las muestras se obtuvieron inmediatamente después de la prueba de preferencia de lugar por anfetamina.

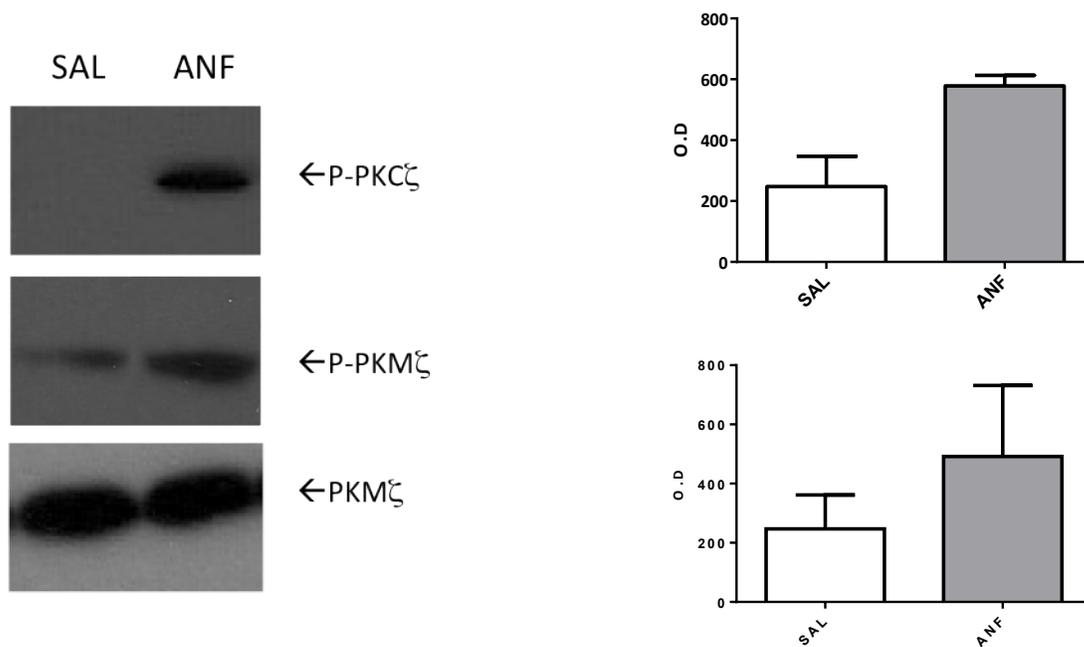
El ensayo consiste en cuantificar la fosforilación sobre un sustrato artificial y de esta forma valorar la actividad quinasa de cada muestra. Este ensayo está diseñado para cualquier miembro de la familia de PKC. Por lo tanto, para medir la actividad del par PKM ζ /PKC ζ , primero se debió inmunoprecipitar con un anticuerpo dirigido contra el c-terminal de PKC ζ y a las muestras inmovilizadas realizarles el ensayo quinasa *in vitro*, como se detalla en métodos. El péptido sintético utilizado es fluorescente lo que permite su cuantificación espectrofotométrica. Además el péptido fosforilado presenta una migración electroforética diferente del péptido no fosforilado lo que posibilita su visualización en un transiluminador y permite aislar los dos péptidos diferencialmente. Como control positivo se utilizó 10ng de PKC ζ purificada. Como control negativo se utilizó RIPA en vez de lisado total.

La figura 12B muestra lo obtenido para las muestras de ratas entrenadas con anfetamina y su control con salino. El inserto de la figura muestra la imagen obtenida de la visualización con UV, donde el péptido fosforilado se muestra arriba y el péptido no fosforilado abajo. El control negativo no presenta banda fosforilada. Además, la cantidad de péptido fosforilado que

se obtiene de las muestras del VTA está dentro del rango que asegura linealidad de la reacción. Nuestros resultados muestran que en los VTA de los animales entrenados con anfetamina existe una tendencia al aumento en la actividad de PKC/PKM ζ comparado con el salino.

FIGURA 12

A



B

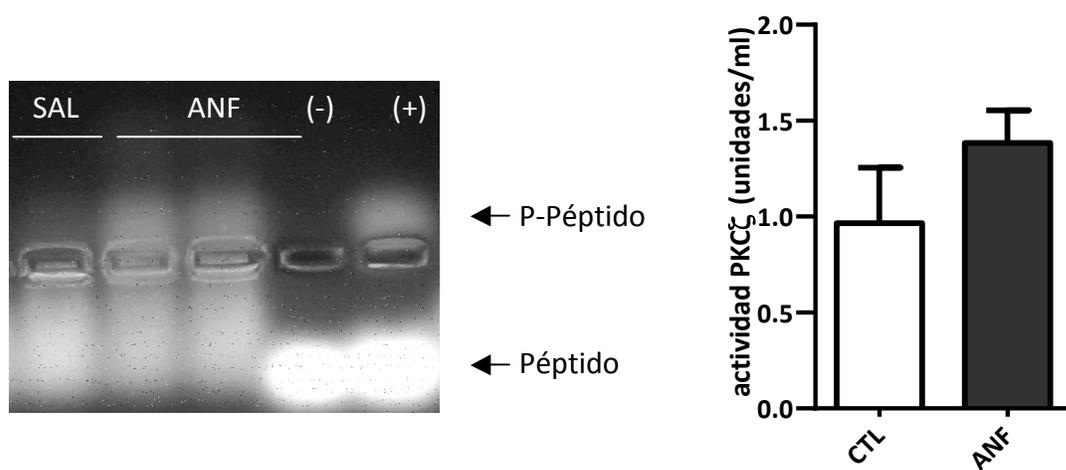


Figura 12: Actividad de PKM ζ y PKC ζ luego del entrenamiento con anfetamina.

A. Western blot para detectar la presencia de la fosforilación de la treonina 410 en inmunoprecipitados de lisado total de VTA, luego del entrenamiento con anfetamina o su control salino. Las muestras fueron inmunoprecipitadas con anti PKC ζ y luego ensayadas con inmunoblot con el anticuerpo fosfo específico. Como control se muestra el western blot contra PKC ζ , luego de la inmunoprecipitación con PKC ζ . Se muestra PKM ζ y PKC ζ fosforilado. Derecha: Cuantificación densitométrica de la banda fosforilada.

B. Determinación de la actividad quinasa *in vitro* en inmunoprecipitados de lisado total del VTA luego del entrenamiento con anfetamina. Izquierda: gel de agarosa donde se muestra el péptido fosforilado (P-péptido) y no fosforilado en las muestras del VTA y los controles positivo (+) y negativo (-). Derecha: cuantificación de la banda del péptido fosforilado medido a 570nm. n=3

1.4. Efecto de la inhibición *in vivo* de PKC ζ /PKM ζ en el VTA de rata sobre las conductas motivadas.

Para determinar el papel de PKM ζ *in vivo*, se decidió realizar infusión directa en el VTA del inhibidor peptídico ZIP, como se ha reportado previamente [118, 124, 132]. Zip corresponde a la secuencia de 10 aminoácidos presentes naturalmente en la región pseudosustrato del dominio regulatorio de PKC ζ [166]. Al ser aplicado exógenamente, ZIP se une a la región catalítica de la quinasa, inhibiendo su actividad. La presencia de una miristoilación permite que el ZIP agregado exógenamente ingrese a la célula [167] y de esta forma inhiba a la quinasa. La capacidad de ZIP de inhibir a PKM ζ y PKC ζ ha sido reportada previamente [168].

Para los ensayos *in vivo*, se eligió una concentración de 10 nmol de ZIP por área, que corresponde a la concentración ampliamente usada de este inhibidor en la literatura [118].

1.4.1. La inhibición de PKC ζ /PKM ζ en el VTA, inmediatamente post entrenamiento, disminuye la búsqueda por recompensantes.

Para evaluar el papel de PKM ζ en las conductas controladas por VTA, las ratas fueron entrenadas en los diferentes paradigmas de búsqueda de recompensante explicados previamente.

Para el entrenamiento de comida se utilizó el paradigma de autoadministración de comida, el cual permite medir la búsqueda del recompensante mediante la ejecución de un comportamiento adquirido. El animal aprende activamente a relacionar que al apretar una palanca dentro de la cámara operante se entrega el recompensante (pellet sabor chocolate). Los detalles del protocolo se muestran en la figura 7 y se detallan en métodos. Luego del aprendizaje se mide la búsqueda por la comida, midiendo las veces que el animal aprieta la palanca. Para determinar si hay una búsqueda activa por el recompensante se decidió al final del entrenamiento aumentar la dificultad para obtener el recompensante. De esta forma el animal necesita hacer más trabajo para recibir la misma cantidad de recompensante. Como se muestra en la figura 13A, luego de finalizado el entrenamiento, las ratas aprenden eficientemente a apretar la palanca activa y no así la palanca inactiva (ver figura 7B). Las barras blancas de la figura 13A corresponden al número promedio de veces que se aprieta la palanca activa.

Para el entrenamiento con anfetamina se utilizó el paradigma de preferencia del lugar condicionado por anfetamina. El resumen del protocolo se muestra en la figura 7A y los detalles experimentales en métodos. En este caso, la rata aprende a asociar el ambiente (caja de CPP) en donde recibe no contingentemente la anfetamina con los efectos recompensantes de la anfetamina. Al final del periodo de entrenamiento el animal tiene libre acceso a todos los compartimentos de CPP pero elige pasar más tiempo en aquel que ha aprendido a asociar a la anfetamina. Este aumento en el tiempo de permanencia en el ambiente asociado a la anfetamina es una medida de la búsqueda por la anfetamina [162]. Como se observa en la figura 14A, las ratas entrenadas con anfetamina presentan al momento del test un aumento en

el tiempo que pasan en el compartimento asociado a la anfetamina (barras negras.) comparado con el tiempo que pasan en ese compartimento antes del entrenamiento (barras blancas)

Para estudiar la función de PKM ζ *in vivo*, se realizó la infusión de ZIP una vez finalizado el entrenamiento, dentro de 2 a 4 horas de terminado el test conductual. De esta forma si PKM ζ está participando en la memoria asociativa en el VTA, la inhibición de esta quinasa anularía el comportamiento aprendido en un segundo test post inhibición.

Como se muestra en la figura 13A y 14A, la infusión en el VTA del vehículo o de ZIP en versión “scrambled” no muestra ningún efecto ni en el número de veces que el animal aprieta la palanca (figura 13A, barras negras) ni en el tiempo que la rata pasa en el compartimento pareado a anfetamina (figura 14A, barras negras).

Sin embargo la infusión de ZIP *intra VTA* genera una disminución del comportamiento de búsqueda por recompensantes. Como se muestra en la figura 13B y 14B. La infusión de ZIP el día anterior disminuye el número de veces que la rata aprieta la palanca (Figura 13B, barras negras) y también disminuye el tiempo de permanencia en el compartimento pareado a anfetamina (Figura 14B, barras negras).

Como se ha demostrado que ZIP inhibe tanto a PKC ζ como a PKM ζ , y tomando en cuenta nuestros resultados del objetivo 1 que muestran que PKC ζ está presente en el VTA de rata, no nos es posible discriminar cuál de esas isoformas está siendo inhibida *in vivo*. Por lo tanto, se consideró que los efectos observados con la infusión de ZIP corresponden a la inhibición del par PKC ζ /PKM ζ .

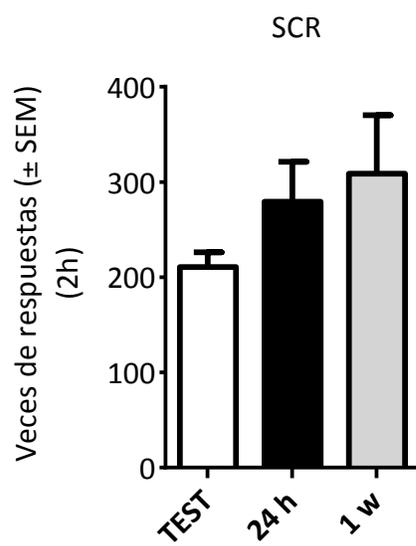
1.4.2. La búsqueda de recompensantes se recupera luego de una semana post inhibición.

Para determinar si el efecto observado con la infusión de ZIP corresponde a un fenómeno en el cual se ha borrado la memoria asociativa a largo plazo, se decidió hacer un tercer test conductual, esta vez, una semana post infusión de ZIP. Durante esa semana las ratas se mantuvieron sin manipulación en sus cajas de mantención. El tiempo sin actividad no afecta la memoria ya que las ratas entrenadas e infundidas con vehículo o con scrambled-ZIP muestran el mismo nivel en la prueba conductual que lo observado antes de la infusión. Sin embargo, como se muestra en la figura 13B y 14B las ratas entrenadas con comida y con anfetamina e infundidas con ZIP intra VTA, vuelven a expresar el comportamiento aprendido, presentando el mismo nivel observado al momento del test, antes de la infusión de ZIP (Figura 13B y 14B, barras grises).

Nuestros resultados sugieren que la inhibición de PKC ζ /PKM ζ interrumpe el comportamiento aprendido inmediatamente post inhibición pero que dicho efecto no se mantiene a largo plazo.

FIGURA 13

A



B

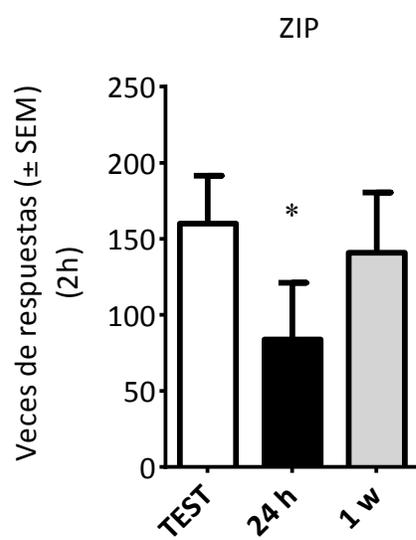
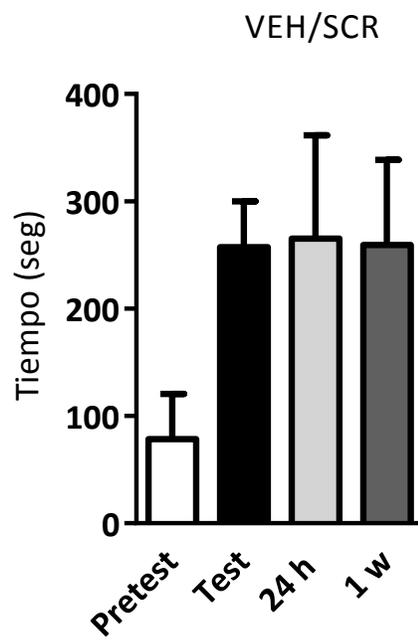


Figura 13: Efecto de ZIP, un inhibidor de PKC ζ /PKM ζ sobre el comportamiento de búsqueda de alimento. Las ratas fueron entrenadas para autoadministrarse pellets de comida como se detalla en métodos y en la figura 7. **A.** Efecto de la infusión de Vehículo (Veh) o Scrambled-ZIP (Scr) sobre la conducta de búsqueda de alimento. **B.** Efecto de la infusión de ZIP sobre la conducta de búsqueda de alimento. Los gráficos muestran la media \pm SEM. Barras blancas: veces que aprieta la palanca luego del entrenamiento. Barras negras: veces que aprieta la palanca luego de la infusión intra-VTA, 24 horas antes. Barras grises: veces que aprieta la palanca luego de una semana post-infusión. N=13. * $p < 0.05$ ANOVA una vía, post hoc de Bonferroni

FIGURA 14

A



B

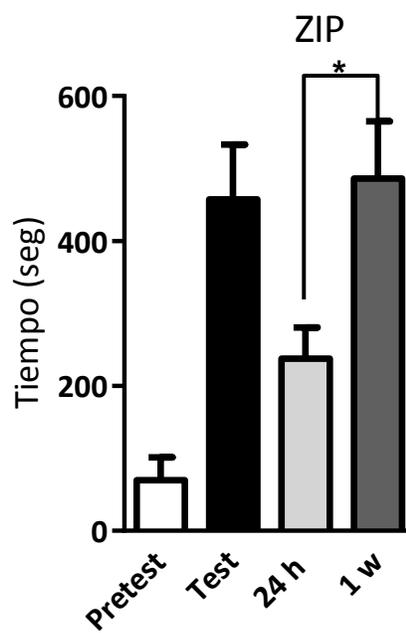


Figura 14: Efecto de ZIP, un inhibidor de PKC ζ /PKM ζ sobre el comportamiento de búsqueda de anfetamina. Las ratas fueron entrenadas en el paradigma de preferencia de lugar condicionado como se detalla en métodos y en la figura 7. **A.** Efecto de la infusión de Veh o Scrambled-ZIP sobre la conducta de búsqueda de anfetamina. **B.** Efecto de la infusión de ZIP sobre la conducta de búsqueda de anfetamina. Los gráficos muestran la media \pm SEM. Barras blancas: tiempo de permanencia en el compartimento antes del entrenamiento. Barras negras: tiempo de permanencia en el compartimento pareado a anfetamina después del entrenamiento. Barras grises: tiempo de permanencia en el compartimento luego de la infusión intra-VTA 24 horas antes. Barras grises oscuras: tiempo de permanencia en el compartimento luego de una semana post-infusión. * $p < 0,05$, ANOVA de una vía, post hoc de Bonferroni.

1.4.3. La inhibición de PKM ζ en el VTA de ratas abstinentes disminuye la búsqueda de recompensantes.

Se ha demostrado que el VTA juega un papel importante en los cambios conductuales a tiempos tempranos y que posteriormente en el periodo sin droga, llamado abstinencia, ocurrirían cambios del tipo plástico principalmente en otras áreas del circuito y ya no en VTA [169-171].

Considerando el resultado anterior y, tomando en cuenta que existe una dependencia temporal entre los cambios plásticos inducidos por recompensantes y particularmente por las drogas de abuso, se decidió utilizar ratas entrenadas con anfetamina y realizar la infusión de ZIP largo tiempo después de concluido el entrenamiento. Si la quinasa PKM ζ juega un rol en la memoria en el VTA, su papel no debería observarse luego de un periodo de abstinencia. Si su función es diferente a la mantención de la memoria, el efecto de la inhibición de PKC ζ /PKM ζ debiera observarse independiente del momento post entrenamiento de la infusión.

Para probar esto se decidió utilizar el entrenamiento con anfetamina y esperar 5 semanas de abstinencia. Durante este tiempo las ratas permanecieron en sus cajas de mantención con agua y comida *ad libitum*. La preferencia por el lugar asociado a anfetamina se verificó todas las semanas y durante este tiempo la preferencia se mantiene e incluso en algunas ratas aumenta. Pasadas 5 semanas de abstinencia, se realizó la infusión de ZIP intra VTA. Nuestros resultados

muestran que luego de la infusión de ZIP se pierde la preferencia por el lugar asociado a anfetamina, resultado similar a lo observado con la infusión de ZIP inmediatamente después del entrenamiento. Más aún, el efecto de la infusión de ZIP se pierde luego de una semana post infusión, indicando una reversibilidad en el efecto. (Figura 15)

Figura 15

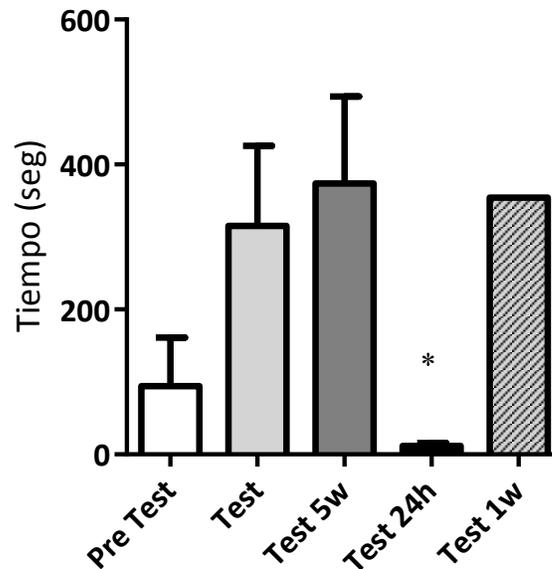


Figura 15: Efecto de ZIP, un inhibidor de PKC ζ /PKM ζ sobre el comportamiento de búsqueda de amfetamina en ratas abstinentes. Las ratas fueron entrenadas en el paradigma de preferencia de lugar condicionado como se detalla en métodos y se mantuvieron en sus cajas de mantención durante la abstinencia. El gráfico muestra la media \pm SEM de la determinación del tiempo de permanencia en el compartimento pareado a amfetamina. Luego de 5 semanas de abstinencia se infundió bilateralmente en el VTA el inhibidor de PKC ζ /PKM ζ , ZIP. Barras blancas: tiempo de permanencia en el compartimento antes del entrenamiento. Barra gris: tiempo de permanencia en el compartimento pareado a amfetamina después del entrenamiento. Barra gris oscura: tiempo de permanencia en el compartimento pareado a amfetamina después de 5 semanas de abstinencia. Barra negra: tiempo de permanencia en el compartimento luego de la infusión intra-VTA 24horas antes. Barra gris con rallas: tiempo de permanencia en el compartimento luego de una semana post infusión.

* $p < 0,05$, ANOVA una vía, Post hoc bonferroni.

1.5. La inhibición de PKC ζ /PKM ζ disminuye los niveles de dopamina en el NAcc.

Nuestros resultados obtenidos no concuerdan con el papel de PKM ζ en memoria en el VTA, sino más bien, muestran que PKC ζ /PKM ζ participa en la conducta dependiente del VTA pero de otra manera. Como ya se mencionó en la introducción, la señalización dopaminérgica en el NAcc es clave para el comportamiento basado en recompensas. Debido a esto, nos propusimos estudiar si la inhibición de PKM ζ en el VTA tiene algún efecto sobre la liberación de dopamina en el NAcc. Para ello, se diseñó un experimento de microdiálisis en animal despierto, en el cual a través de una membrana de diálisis se recupera el contenido extracelular del NAcc mientras el animal está realizando alguna conducta. Como nuestros resultados de entrenamiento con recompensante natural o droga de abuso muestran los mismos efectos luego de la inhibición de PKM ζ , y considerando las factibilidades técnicas, se decidió utilizar el paradigma de autoadministración con comida para evaluar cambios en los niveles de dopamina en el NAcc.

Las ratas se dividieron en 3 grupos, ratas sin entrenamiento (pre test), ratas entrenadas a administrarse comida (Test) y ratas entrenadas con infusión de ZIP intra VTA 24 hrs antes (24h). Luego de un periodo de estabilización de la cánula de diálisis, las ratas se colocaron en las cámaras de autoadministración y se recuperó el contenido extracelular de dopamina. La figura 16 muestra el análisis del contenido extracelular de dopamina en el NAcc medido por HPLC-EC.

FIGURA 16

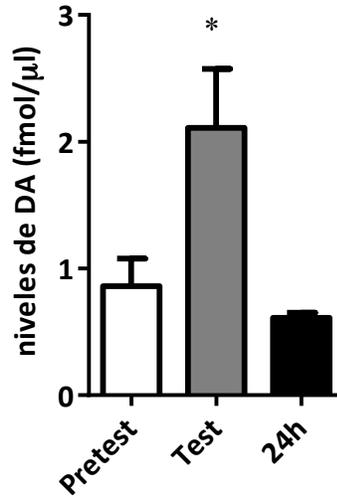


Figura 16. Efecto de la inhibición de PKC ζ /PKM ζ en los niveles extracelulares de dopamina en el NAcc. La DA extracelular en el NAcc fue recolectada por microdiálisis. La concentración de DA en el dializado se analizó por HPLC-EC. El grafico muestra la media \pm SEM. Barras blancas: niveles extracelulares de DA antes del entrenamiento con comida. Barras grises: niveles extracelulares de DA en la ultima sesión del entrenamiento con comida. Barras negras: niveles extracelulares de DA luego de una infusión de ZIP intra VTA. n=4.

* $p < 0,05$ ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni

IV. DISCUSION

Expresión y distribución homogénea de PKM ζ en el VTA

Como ya se mencionó, el VTA es un núcleo anatómica y funcionalmente heterogéneo. Se ha descrito que las regiones medial-posterior del VTA, pero no así las regiones anteriores, controlan las conductas asociadas a estímulos recompensantes [27] [28]. Además, no solo existe una organización antero-posterior, sino que además se ha descrito que las neuronas dopaminérgicas del VTA se organizan funcionalmente de manera dorso-ventral; es así que se ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas del VTA dorsal se excitan con estímulos diferentes que las neuronas dopaminérgicas ventrales [39]. Considerando lo anterior, es interesante notar que nuestros datos muestran que PKM ζ se expresa en el VTA de manera homogénea tanto antero-posteriormente como dorso-ventralmente. Nuestro análisis de expresión de mRNA muestra que la región del VTA dónde existiría una menor expresión de PKM ζ es la zona más caudal del VTA denominada la cola del VTA (VTT, por sus siglas en inglés VTA tail). Esta región, presenta un fenotipo principalmente GABAérgico. El VTT es probablemente la región menos estudiada del VTA ya que sólo recientemente se ha llegado a un consenso en que esta área efectivamente pertenece al VTA, por lo que la literatura es confusa en el estudio de esta zona, existiendo, incluso diferentes nombres para ella [172].

Además, en nuestra caracterización de la expresión de PKM ζ encontramos que PKM ζ se expresa en el VTA tanto en neuronas de fenotipo dopaminérgico como no dopaminérgico. La caracterización neuronal del VTA ha determinado que en el VTA co-existen diferentes fenotipos neuronales: neuronas dopaminérgicas de proyección, interneuronas GABAérgicas [173], neuronas GABAérgicas de proyección [174] y neuronas glutamatérgicas de proyección, existiendo aun debate sobre la existencia de estas últimas como neuronas independientes, ya que se ha reportado una co-liberación de Glutamato con dopamina desde las neuronas dopaminérgicas del VTA [175, 176]. Dentro del VTA, las neuronas dopaminérgicas han sido implicadas en los procesos neurofisiológicos de la motivación, aprendizaje basado en recompensa, predicción de error e importancia del estímulo (revisado en [177]). Es precisamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA la que es modulada por las diferentes drogas de abuso. Sin embargo, se ha demostrado que las neuronas GABAérgicas del propio VTA tienen un control sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas, antagonizando su función [86, 178]. Hasta la fecha no existe un estudio que haya caracterizado el papel de PKM ζ en distintos fenotipos neuronales, por lo que desconocemos si la PKM ζ expresada en neuronas dopaminérgicas está ejerciendo la misma función que en las neuronas no-dopaminérgicas.

En esta tesis, no hemos determinado cuál es la consecuencia fisiológica de la expresión homogénea de PKM ζ en las distintas regiones del VTA. Sin embargo, es tentador sugerir que PKM ζ en el VTA podría tener un papel en el funcionamiento basal de este núcleo, de manera tal, que sea requerida en todas las regiones del VTA y en células de distinto fenotipo. También cabe la posibilidad que PKM ζ cumpla un papel diferente dependiendo de la subregión del VTA donde se expresa (función diferencial).

Respecto a la función de PKM ζ , se ha descrito que PKM ζ controla el movimiento de los receptores AMPA hacia la membrana plasmática [131], a través de un mecanismo dependiente del factor sensible a N-etilmaleimida (NSF) [122], sin embargo todos los estudios sobre la función de PKM ζ se han centrado en la post-sinapsis glutamatérgica. En la literatura no se encuentran antecedentes sobre la caracterización de PKM ζ en una sinapsis distinta.

En esta tesis, intentamos detectar PKM ζ en neuronas GABAérgicas del VTA, y para ello se realizó inmunofluorescencia contra la enzima glutámico descarboxilasa (GAD) (no mostrado), enzima clave en la síntesis del neurotransmisor GABA. La inmunoreactividad de GAD presenta un patrón punteado difuso en el VTA, no somático, lo cual no permite estudiar la presencia del mensajero de PKM ζ en este tipo de neuronas en el VTA.

PKM ζ y PKC ζ

En esta tesis encontramos que el VTA además de expresar PKM ζ , expresa también PKC ζ . En el trabajo de Hernández y colaboradores del 2003 [140] se demostró, por primera vez, la existencia de PKM ζ como una proteína de expresión independiente de PKC ζ . En ese trabajo, se describió que PKM ζ era la isoforma expresada en cerebro y que PKC ζ no existía en cerebro anterior de rata. Muchos trabajos han evaluado la función de PKC ζ en tejidos periféricos, dónde se ha demostrado que su función es bastante pleiotrópica. Es así que encontramos que PKC ζ es requerida para la polaridad celular [179], para la estabilidad de los microtúbulos [180, 181], esta desregulada en ciertos tipos de cáncer [182, 183], participa en la modulación de la respuesta inmune [166] y en la tolerancia a la glucosa [184], entre otros efectos. Así, cuando se descubrió PKM ζ como producto génico independiente de PKC ζ , inmediatamente se

propuso que PKC ζ era la isoforma expresada en tejido periférico y PKM ζ era la isoforma de cerebro. Los artículos que siguieron a este descubrimiento evaluaron la función de PKM ζ considerando que sólo PKM ζ se expresaba en el área cerebral estudiada [118, 124] Sin embargo, existen algunos artículos que muestran efectos de PKC ζ en tejido neuronal. Se ha demostrado que PKC ζ se activa en respuesta a 6-hidroxidopamina en un modelo de célula dopaminérgica [185], y en respuesta a LPS en el hipotálamo [186].

Nuestros resultados muestran que junto con PKM ζ , el mensajero de PKC ζ también está presente en VTA, aunque sus niveles de expresión son mucho menores que PKM ζ . Sorprendentemente, también detectamos el mensajero de PKC ζ en extractos totales de hipocampo. Por mucho tiempo se ha asumido que PKC ζ no se expresa en el hipocampo, amígdala, corteza, Núcleo accumbens, y otros núcleos más. Estudios *in silico* realizados en nuestro laboratorio (no mostrado) analizando las bases con datos de CAGE (“cap analysis gene expression”) en el cerebro de rata sugieren fuertemente que casi no se utiliza el promotor de PKC ζ en áreas corticales. En cambio si se utilizarían muchos otros posibles sitios de inicio de la transcripción. Entre ellos destaca el de PKM ζ y otro sitio que se ubica río abajo del +1. Lamentablemente no existe en las bases de datos un análisis de expresión en el cerebro medio o en el cerebro posterior, por lo que es difícil estimar si la distribución de PKC ζ es región específica.

Una posible explicación para la discordancia en la expresión de PKC ζ en hipocampo, es que en nuestra disección de hipocampo incluimos toda el área del hipocampo desde aproximadamente 4 a 6mm posterior a bregma. Es posible que en el artículo de Hernández del 2003, se haya considerado solo el área anterior del hipocampo, o que la disección se realizara

en secciones horizontales, abarcando distintas subzonas del hipocampo. Nuestros ensayos de western blot también muestran una expresión de la isoforma larga. Sin embargo, el análisis debe ser cauteloso, ya que los anticuerpos comercialmente disponibles no discriminan entre las PKC atípicas, PKC ζ y PKC ι , las cuales presentan una gran identidad de secuencia. Debido a esto, muchos artículos en la literatura han sido cautelosos y los estudios consideran los efectos de ambas isoformas, hablando de aPKC (PKC atípicas) refiriéndose a las dos (PKC ζ y PKC ι).

Considerando lo anterior, para la interpretación de los ensayos de inhibición de la quinasa *in vivo* (utilizando el inhibidor ZIP) nuestros resultados se expresaron como inhibición de PKC ζ /PKM ζ *in vivo* y en los ensayos de western blot, se identificó la banda de mayor tamaño como aPKC.

Expresión de PKM ζ en el VTA de ratas entrenadas con recompensantes.

Como PKM ζ se expresa a partir del intrón 4 del gen de la PKC ζ , la estructura de PKM ζ carece de dominio regulatorio. Debido a esto, consideramos que una posible forma de regulación de PKM ζ es a nivel del aumento o disminución de la masa total de la proteína. Por ello, decidimos evaluar cambios en la expresión de PKM ζ , midiendo la expresión del mensajero y de la proteína en el VTA de ratas entrenadas con recompensantes. Como recompensantes utilizamos un recompensante natural (comida) y una droga de abuso (anfetamina).

Las ratas entrenadas para conseguir la comida, adquirieron la conducta antes de una semana de entrenamiento. El entrenamiento se realizó con un FR: 1, es decir, cada vez que la rata apretaba la palanca activa se entregaba un pellet de comida. La conducta adquirida se midió el

ultimo día de entrenamiento (día 7) como el número de veces que la rata aprieta la palanca en un esquema FR: 3, es decir la rata debe apretar 3 veces la palanca para recibir un pellet. Este cambio en el FR, se realizó de manera de medir el esfuerzo que la rata realiza para poder obtener el recompensante. Este aumento en el trabajo efectuado en la acción de obtener el recompensante es una medida del refuerzo positivo de la comida.

Luego de una semana de entrenamiento se obtiene un variación menor al 15% en 3 días consecutivos, parámetro utilizado para evaluar la adquisición de la conducta aprendida [106]. (Figura 7B). Luego de la semana de entrenamiento prácticamente (>95%) todas las ratas adquirieron la conducta.

Para el caso de anfetamina, se utilizó como modelo de búsqueda por la droga, el paradigma conductual de preferencia de lugar o CPP. Este modelo se basa en obtener un aumento del tiempo en que el animal pasa en el compartimiento en que recibió la inyección de la droga. Este aumento en el tiempo sugiere efectos de refuerzo positivo [162]. En nuestro modelo usado, luego de las dos semanas de entrenamiento con anfetamina, se obtiene entre un 70-75% de ratas que adquieren la conducta del total de ratas entrenadas (Figura 7A). En el CPP se evalúa que la rata asocie el contexto del compartimiento en donde fue entrenada con los efectos de la anfetamina. El “test” para medir la conducta adquirida se realiza en una sesión libre de anfetamina, y se mide el tiempo que la rata pasa en el compartimiento pareado a la droga.

Nosotros determinamos los niveles de expresión de PKM ζ en el VTA de rata inmediatamente después del test conductual. Nuestros datos muestran que tanto el mensajero de PKM ζ como la proteína no cambian sus niveles luego de finalizado el entrenamiento con recompensantes.

Debido a esto, decidimos evaluar la expresión del mensajero de PKM ζ a distintos tiempo de condicionamiento con anfetamina. Nosotros encontramos que una única dosis de anfetamina es capaz de disminuir el mensajero de PKM ζ . Hasta la fecha no se ha reportado una disminución de PKM ζ en ninguna área del cerebro, por lo que sería interesante evaluar que proteínas se están uniendo al promotor de PKM ζ y si están mediando esta disminución, o si la disminución ocurre a nivel de la estabilidad del mensajero. Es importante notar, que luego de una dosis de anfetamina no existe preferencia por el lugar asociado a anfetamina por lo que es imposible relacionar esta disminución con algún aspecto de la memoria asociativa. Sin embargo, los estudios electrofisiológicos en neuronas dopaminérgicas del VTA, han demostrado que una única dosis de diferentes drogas de abuso, incluida la anfetamina, es capaz de inducir un cambio en las corrientes excitatorias mediada por receptores del tipo AMPA. Es posible que la disminución en el mensajero observada se deba a un mecanismo compensatorio a este aumento de actividad, similar a los mecanismos homeostáticos que ocurren por acción de las drogas de abuso.

Además, nosotros encontramos que luego de los días de entrenamiento se recupera la expresión de PKM ζ , obteniendo una estabilización de los niveles de expresión de PKM ζ a lo largo del entrenamiento. Este resultado sumado a la expresión homogénea y falta de cambio en la expresión de PKM ζ nos muestran que en el VTA existen mecanismos para mantener la expresión de PKM ζ constante. Sería interesante determinar las consecuencias fisiológicas de este fenómeno.

En la literatura existente sobre la función de PKM ζ , se encuentran pocos estudios en los que se haya evaluado cambios en la expresión de PKM ζ . Uno de ellos realizado en rebanadas

de hipocampo, mostró una modesta inducción de PKM ζ luego de la estimulación tetánica para inducir LTP *in vitro*. Nosotros no encontramos esa inducción en el VTA, esto puede deberse a: diferencia en la fisiología del área estudiada, la diferencia entre los tipos de ensayo *in vivo* e *in vitro*, etc. Sin embargo, cabe la posibilidad de que la diferencia principal esté dada por que la función de PKM ζ en el VTA sea diferente a la propuesta para hipocampo (como se discute más adelante). Queda por determinar si en el VTA la expresión de PKM ζ se mantiene estable, ya sea porque no participa en el entrenamiento o por un mecanismo activo de mantención de los niveles constantes.

Un hallazgo interesante que encontramos en nuestro modelo de CPP fue observar que la conducta de búsqueda por amfetamina se mantiene largo tiempo después de terminado el entrenamiento (<5 semanas post entrenamiento). Nosotros observamos que las ratas que adquirieron la conducta son capaces de expresarla aun tras un largo periodo de abstinencia.

Actividad de PKM ζ en el VTA luego del entrenamiento con recompensantes

Aunque no detectamos cambios en la expresión de PKM ζ luego del entrenamiento con recompensantes, nosotros hipotetizamos que el entrenamiento modifica la actividad de la quinasa, y de esta forma PKM ζ participa en la conducta. Por ello, decidimos evaluar la actividad de PKC/PKM ζ en el VTA de ratas entrenadas utilizando 3 aproximaciones diferentes: detección de la fosfoproteína (ensayo indirecto de actividad), ensayo *in vitro* de la actividad quinasa e inhibición de la actividad *in vivo* utilizando infusión del inhibidor directamente en el VTA.

Se ha descrito que la actividad de PKM ζ puede ser modulada por modificaciones post-traduccionales. El grupo de Todd Sacktor, mostró que PKM ζ posee un sitio de fosforilación en el residuo de treonina 410 (T410) (también presente en PKC ζ). Esta fosforilación genera un aumento de la actividad quinasa de PKM ζ y es realizada por la enzima PDK1 [147]. Utilizando el anticuerpo fosfo-específico para T410, realizamos ensayos de western blot en inmunoprecipitados de lisado total de VTA de ratas controles y ratas entrenadas con anfetamina que adquirieron la conducta. Encontramos que en el VTA de ratas tratadas con anfetamina aumenta el nivel de fosforilación tanto en aPKC como en PKM ζ .

Además, realizamos ensayos *in vitro* de actividad quinasa utilizando un sustrato artificial fluorescente fosforilable. Este ensayo permite evaluar la actividad de cualquier isoforma de PKC. Considerando que prácticamente se pueden encontrar todas las isoformas de PKC presentes en un mismo tejido, los extractos del VTA de ratas controles y ratas entrenadas con anfetamina fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo para PKC ζ . De esta forma, la quinasa inmovilizada en las “beads” de inmunoprecipitación se sometió al ensayo quinasa. Nuestros resultados muestran una leve tendencia al aumento de la actividad aPKC en el lisado de ratas entrenadas con anfetamina. Sin embargo, encontramos que la sensibilidad de la técnica no es suficiente para este tipo de determinación. Además observamos una variabilidad alta entre las mediciones, por lo que es difícil considerar un análisis más exhaustivo de los datos obtenidos con esta técnica. Probablemente la dificultad radique en el hecho de que la enzima se

encuentra inmovilizada en las “beads” unida a un anticuerpo, lo cual podría afectar la interacción y acción de la enzima con su sustrato.

Para determinar el papel de PKM ζ en el VTA se realizó el ensayo *in vivo* de inhibición de la quinasa y evaluación de la consecuencia fisiológica de esta inhibición.

En los últimos 4 años ha habido un aumento exponencial de las publicaciones sobre la función de PKM ζ en memoria utilizando diferentes paradigmas y en distintas áreas del cerebro. Todos los estudios han evaluado la participación de la actividad de PKM ζ utilizando la perfusión directa de un péptido inhibidor específico para PKC/PKM ζ , ZIP. ZIP, es un péptido sintético con el N-terminal miristoilado lo que le permite la entrada a las células. ZIP corresponde a 13 aminoácidos naturalmente presentes en el dominio regulatorio de PKC ζ en las posiciones 113 a 125 [166]. La función de estos aminoácidos es actuar como un pseudo-sustrato, interactuando y uniéndose a la región catalítica de la enzima [166], manteniendo a la enzima en un estado auto-inhibido. La presencia de segundos mensajeros libera la auto-inhibición, permitiendo a la enzima alcanzar sus blancos moleculares. Este es un mecanismo de regulación observado en todos los miembros de la familia de PKC [187]. Sin embargo, PKM ζ al carecer del dominio regulatorio no posee esta región pseudo-sustrato, razón por la cual se ha aceptado como una isoforma constitutivamente activa. La presencia intracelular de ZIP inhibe PKM ζ ya que restituye la inhibición. Se ha demostrado que la aplicación de ZIP inhibe a PKC ζ [166] y a PKM ζ [168].

Mediante la perfusión de ZIP, se ha demostrado que la inhibición de PKM ζ interrumpe y anula la memoria a largo plazo en hipocampo [118], corteza insular [124, 125, 188], corteza

sensori-motora [189], corteza cingulada [190], amígdala basolateral [129, 131, 191] y NAcc [132, 134, 192].

Nuestros resultados muestran que al inhibir PKC/PKM ζ con ZIP en el VTA de rata se pierde la conducta adquirida. La pérdida de la conducta se observó tanto para un recompensante natural como para una droga de abuso. Es interesante hacer notar que la magnitud del efecto es diferente siendo más fuerte en el entrenamiento con comida que con anfetamina (Ver gráfico Figura 17). No podemos descartar que este efecto se deba a la diferencia entre los modelos conductuales usados (caja de Skinner versus CPP), aunque es tentador especular que la diferencia esté dada por la “fuerza” entre los dos recompensantes como se ha señalado anteriormente [106].

Nuestros resultados muestran que para las conductas adquiridas basadas en recompensantes se requiere la actividad de PKM ζ en el VTA. Recientemente se ha demostrado la participación de PKM ζ en el VTA de ratas tratadas con cocaína, donde se demostró que la inhibición de PKM ζ mediante infusión de ZIP; revierte la preferencia de lugar asociado a cocaína y anula el LTP inducido por cocaína en el VTA [193].

Sin embargo, para poder evaluar si la actividad de PKM ζ en el VTA está involucrada en memoria a largo plazo, evaluamos la conducta una semana después de la infusión de ZIP. Las ratas en esa semana se mantuvieron en sus jaulas de mantención y no se les realizó ninguna manipulación. Sorprendentemente, la conducta de búsqueda por el recompensante, tanto comida como anfetamina, reaparece luego de una semana. Es interesante notar, que el efecto de la inhibición de PKM ζ es el mismo si la inhibición se realiza inmediatamente después de entrenamiento o con varias semanas de diferencia (>5 semanas). Se ha demostrado que la plasticidad inducida por las drogas de abuso en el VTA ocurre temprano en el tratamiento, sin

embargo luego de los días de entrenamiento con drogas de abuso, los cambios plásticos se pierden y se generan cambios en otras áreas del cerebro (Hipótesis de la transferencia de plasticidad desarrollada por el grupo de M. Wolf [171]). De esta forma, si la función de PKM ζ en el VTA consistiera en mantener los cambios plásticos, nosotros hubiésemos esperado una diferencia en la respuesta a la inhibición de PKM ζ en nuestras ratas abstinentes, es decir, que la inhibición de PKM ζ no produjera efecto o un efecto menor. Sin embargo, la magnitud y el tipo de efecto es el mismo.

Nuestros resultados son contrarios a lo que sucede en otras áreas del cerebro dónde una vez inhibida PKM ζ la conducta se pierde irreversiblemente. Esto puede deberse a diferentes motivos. Primero puede ser que en el VTA la dosis utilizada es insuficiente para lograr una inhibición total de la actividad y podría ser que la actividad remanente logre reinstalar los cambios moleculares asociados a la conducta adquirida. Se ha sugerido, aunque no demostrado, que existiría un “loop” positivo de mantención de los cambios moleculares (como expresión de receptores en superficie, modificaciones post-traduccionales, etc.) asociados al aprendizaje y memoria.

Una segunda opción, es que el circuito neuronal estudiado es claramente distinto. El circuito mesocorticolímbico, es un circuito integrado donde el VTA juega un papel central. El VTA envía proyecciones hacia diferentes áreas. Desde estas áreas se envían proyecciones de vuelta al VTA. Se ha descrito que las drogas de abuso generan cambios plásticos en el VTA y también en el NAcc. Esto sugiere que los cambios asociados a este tipo de recompensantes ocurren en distintas áreas del cerebro. Considerando lo anterior, es posible especular que como

el VTA es parte de este circuito, la inhibición de PKM ζ en el VTA anule la conducta, pero la actividad de otras áreas del cerebro sea capaz de hacer reaparecer la conducta.

Una tercera opción es que la actividad de PKM ζ en el VTA sea necesaria para la ejecución de las conductas motivadas y no para la memoria a largo plazo. Esta idea surge de la observación que la conducta reaparece sin necesidad de un nuevo entrenamiento. Esta posibilidad será discutida a continuación.

FIGURA 17

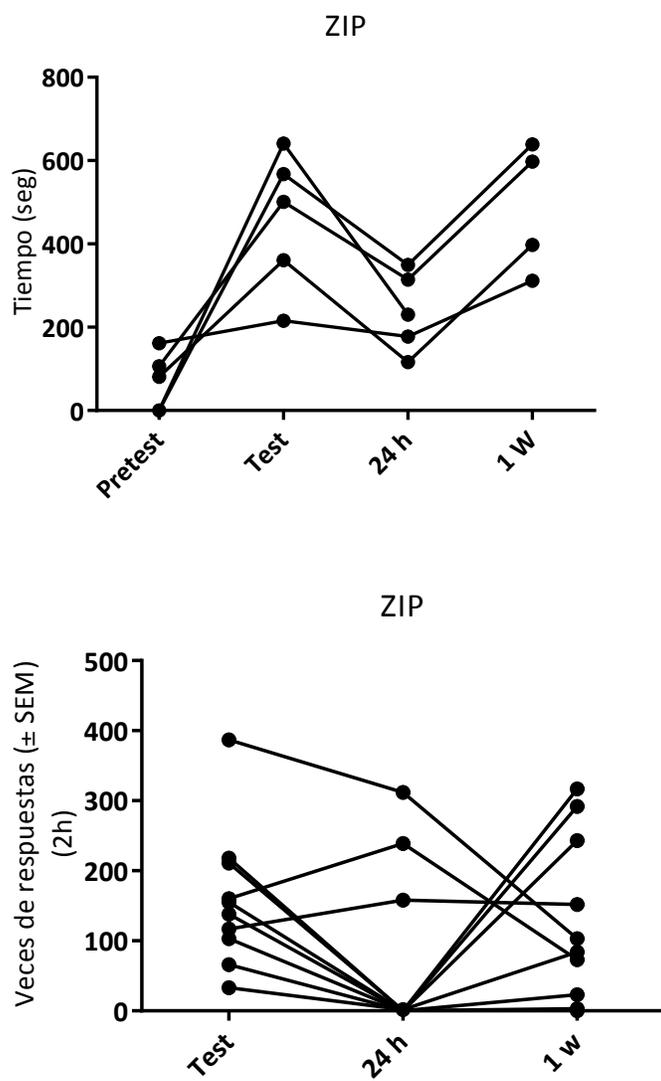


Figura 17: Comportamiento de cada rata en los paradigmas conductuales respectivos

Arriba: Tiempo de permanencia en el compartimiento pareado a anfetamina, antes del entrenamiento, pretest, luego del entrenamiento, Test, luego de la infusión de ZIP, 24h, y luego de 1 semana post infusión, 1w.

Abajo: Número de veces que la rata aprieta la palanca activa luego del entrenamiento, test, luego de la infusión de ZIP, 24h, y luego de 1 semana post infusión, 1w.

Papel de PKC ζ /PKM ζ en las conductas motivadas: Hipótesis de la ejecución.

Es posible que la actividad de PKC/PKM ζ sea necesaria para ejecutar la conducta aprendida y no para la formación y almacenamiento de la memoria a largo plazo. Si analizamos los resultados ahora mirando a PKM ζ como una proteína necesaria para la ejecución de lo aprendido, notamos que al realizar el test al día siguiente de la inhibición de PKM ζ , ésta se encuentra inhibida y no se puede ejecutar la conducta (Fig. 13 y 14). Luego de una semana, el inhibidor probablemente se ha degradado y en ese escenario, PKM ζ es capaz de realizar su función, de esta forma la conducta adquirida se ejecuta correctamente (reversión). Y esta función se mantendría en el tiempo, lo que explicaría que observáramos el mismo efecto inmediatamente después del entrenamiento y luego de un periodo de abstinencia. Esta idea fue sugerida por primera, y única vez, por Parson y Davis el año 2011 [194]. En ensayos de inhibición de PKM ζ en la amígdala y evaluación de conductas en respuesta a miedo, al no exponer a las ratas al test post inyección, los investigadores encontraron que la conducta a la semana se recupera. Sin embargo, cuando las ratas se someten a un test post inyección y luego se prueban una semana después la conducta se pierde. Ellos proponen que PKM ζ sería necesaria para ejecutar la conducta y no para el almacenamiento de la memoria. Nuestros resultados avalan la hipótesis propuesta por Parson y Davis y proponen un cambio conceptual en la función de PKM ζ .

Si asumimos que la función de PKM ζ en el VTA es de ejecutar la conducta, su actividad se requeriría cada vez que se necesite ejecutar la conducta, independiente del tiempo transcurrido luego del entrenamiento.

Con la nueva hipótesis del papel de PKM ζ , no es posible re explicar todos los trabajos que hay en el área. El trabajo del 2007 del grupo de Sacktor [118] demostró elegantemente que la inhibición de PKM ζ , mediante la infusión directa de ZIP, borra irreversiblemente la memoria dependiente de hipocampo. Los ratones entrenados a evitar una zona espacial asociada a una descarga eléctrica, vuelven a explorar esa área luego de la inhibición de PKM ζ . El efecto de ZIP se observa a las 2 horas post infusión y se mantiene hasta por 2 meses luego del entrenamiento. Por lo que es posible que PKM ζ cumpla distintas funciones en distintas áreas cerebrales.

Para determinar si la inhibición de PKC/PKM ζ interrumpe la ejecución de la conducta, decidimos evaluar la función de VTA en presencia del inhibidor de PKM ζ . Para ello, utilizamos el paradigma de autoadministración de comida como modelo conductual, ya que presenta un mejor rendimiento y una menor variabilidad en la conducta adquirida. Evaluamos la funcionalidad del VTA realizando ensayos de microdiálisis en el NAcc en ratas despiertas, obteniendo los dializados mientras la rata se encuentra en la cámara operante. Nuestros resultados muestran que luego de la inhibición de PKC/PKM ζ existe una disminución de los niveles basales de dopamina en el NAcc. Esto nos sugiere que la inhibición de PKM ζ en el VTA genera una hipofunción de la actividad del núcleo. Esta hipofunción podría estar relacionada a la insuficiencia de la respuesta conductual observada luego de la inhibición de PKM ζ . Nuestros resultados sugieren que PKC/PKM ζ estaría controlando los niveles de dopamina en el espacio extracelular. Sin embargo, el o los mecanismos moleculares quedan aún por ser determinados.

Posibles blancos celulares de PKC/PKM ζ en el VTA.

Se ha descrito que la fosforilación de TH, enzima clave en la síntesis de DA, es el mecanismo principal responsable del mantenimiento de los niveles de DA en el tejido después de la secreción de DA. TH puede ser fosforilada en residuos de serina (posiciones 8, 19, 31 y 40) [195, 196] donde la fosforilación en ser31 y ser40 generan una activación de la enzima. Además, se ha descrito que los cambios en la expresión de TH o su fosforilación son un mecanismo para generar un aumento en la DA liberada en NAcc desde el VTA [197].

Aunque no se ha demostrado que PKC ζ /PKM ζ fosforile directamente a TH, es tentador especular que siendo PKC ζ /PKM ζ una quinasa que fosforila en residuos de serina y treonina, la actividad de esta quinasa podría estar modulando la fosforilación de TH. Para probar si la inhibición de PKC ζ /PKM ζ afecta la fosforilación en TH, se decidió inmunoprecipitar las proteínas que presenten fosforilada una serina o treonina, utilizando un anticuerpo específico. Se utilizó lisado total de NAcc de ratas naive y luego de la inmunoprecipitación se realizó un Western Blot contra TH. Lo obtenido se muestra en la Figura 18. Como se observa no existe un cambio en la fosforilación de TH, luego del tratamiento con ZIP. Además la cantidad total de TH presente en terminales dopaminérgicos en el NAcc no cambia luego del tratamiento con ZIP (Figura 18). Si bien este resultado es preliminar, nos está sugiriendo que el tratamiento con ZIP no disminuye la fosforilación de TH, por lo que cambios en la fosforilación de TH no serían responsables de la disminución de DA observada por microdiálisis.

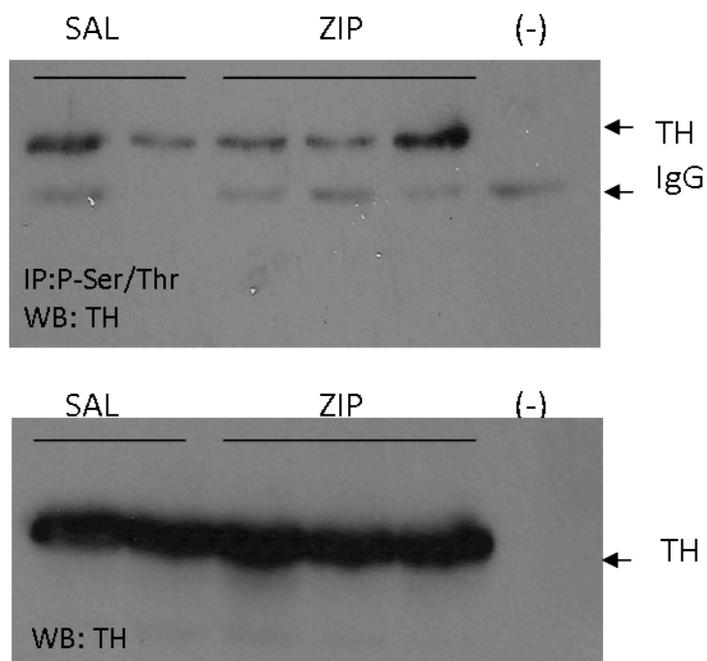
FIGURA 18

Figura 18: Niveles de fosforilación de Tirosina Hidroxilasa en terminales dopaminérgicos. Muestras de lisado del NAcc de ratas infundidas con ZIP o Veh en el VTA que se inmunoprecipitaron con anti fosfo ser/thr y se revelaron contra TH.

Se ha descrito que la actividad de las PKC atípicas (dónde está incluida PKC ζ) contribuye a la polaridad neuronal [181]. Si bien, este antecedente se obtuvo en el contexto del desarrollo de conexiones neuronales, desconocemos si el entrenamiento con recompensantes generaría algún re-arreglo en las conexiones de las neuronas del VTA. En este escenario, la inhibición de PKC/PKM ζ podría modificar la conectividad de estas neuronas y afectar la transmisión dopaminérgica.

Además, se ha descrito que la actividad de aPKC permite la organización de los microtúbulos en neuronas en cultivo [181]. Es posible que al inhibir PKC ζ /PKM ζ se esté interrumpiendo el flujo continuo interno de la neurona. En este sentido, se ha descrito que la despolimerización de los microtúbulos interrumpe el transporte vesicular de DA. El tratamiento de agentes desestabilizadores de microtúbulos en neuronas dopaminérgicas genera una acumulación de vesículas de dopamina en el soma y la posterior salida de dopamina desde estas vesículas [198]. Por lo que podría ser que la inhibición de PKC/PKM ζ en VTA este interrumpiendo el transporte vesicular de DA, a través de modulación en el citoesqueleto de microtúbulos.

Otra alternativa podría ser que la inhibición de PKC ζ /PKM ζ en el VTA genera un defecto en la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas, lo que se traduce en una incapacidad de ejecutar la conducta y de liberar dopamina en respuesta al ambiente asociado al recompensante. Esta idea surge de un estudio donde se analizó la generación de potenciales de acción evocados por el factor de crecimiento neuronal (NGF) en neuronas sensoriales de la raíz del ganglio dorsal. Utilizando tanto ZIP como la disminución de PKM ζ por siRNA, se

demonstró que la inhibición o disminución de PKM ζ , pero no de PKC ζ o PKC ι , genera un bloqueo total de los potenciales de acción evocados [148]. Es posible que un fenómeno similar esté ocurriendo en el VTA de rata.

Otra alternativa es que PKC ζ /PKM ζ participe río abajo en alguna vía de señalización relevante para la ejecución de la conducta o para la liberación de dopamina. Al respecto se ha demostrado que PKC ζ está río abajo de la activación del receptor de EGF en células neoplásicas [199]. También se ha demostrado que PKC ζ es necesaria para los efectos celulares de las ceramidas y de esta forma altera la acción de la insulina [200]. PKC ζ y Akt2 interactúan intracelularmente, PKC ζ fosforila a Akt2 y la inhibe y se ha sugerido que esta interacción ocurre en microdominios de membrana ricos en caveolina [201]. Además, se ha demostrado que PKC ζ se encuentra río abajo de la señalización del receptor de insulina y media el efecto de la insulina sobre la síntesis de proteínas [202]. Además se ha demostrado que PKC ζ fosforila directamente al sustrato del receptor de insulina (IRS-1) [203]. En este sentido, se ha demostrado que la aplicación directa de la insulina en el VTA disminuye la ingesta de sacarosa en ratas [204] e induce una depresión a largo plazo (LTD) en las sinapsis excitatorias de las neuronas dopaminérgicas del VTA, efecto mediado por la inhibición presináptica de la liberación de glutamato por endocannabinoides [205]. Se ha descrito también que el sustrato de insulina 2 (IRS-2) modula positivamente la preferencia de los ambientes asociados a cocaína y su bloqueo genera lo contrario [206]. Mas aún, un defecto en IRS-2 genera un detrimento en la actividad de PKC ζ . Considerando lo anterior podría ser que esta vía de señalización sea

importante para la ejecución de la conducta y que la inhibición de PKC ζ /PKM ζ bloqueé esta vía de señalización.

Por último, hasta la fecha no se ha estudiado la función de las células no neuronales en la actividad del VTA. Desconocemos si la inhibición de PKC ζ /PKM ζ podría estar afectando el papel de estas células en, por ejemplo, la liberación de dopamina. Este punto corresponde a un área de estudio aún no abordado hasta ahora.

Controversia y nueva evidencia sobre la función de PKM ζ .

Recientemente fueron publicados los datos de ratones deficientes para PKM ζ (KO). Lee y colaboradores [207] generaron un ratón KO con delección del exón 9 del gen de PKC ζ . Independientemente, Volk y colaboradores [208] generaron un ratón KO con delección del exón 11 del gen de PKC ζ y además, un ratón deficiente inducible de PKM ζ en las zonas de cerebro anterior. Utilizando distintas pruebas experimentales, condicionamientos dependientes de diferentes áreas cerebrales y protocolos de inducción de LTP; ambos grupos de investigación concluyeron tajantemente que PKM ζ no es requerida para el aprendizaje y memoria, ni para el LTP en hipocampo. Estos resultados están en clara oposición con las publicaciones que han propuesto la participación de PKM ζ en memoria, mencionadas a lo largo de esta tesis. En dichos trabajos, se ha demostrado la participación de PKM ζ basándose principalmente en la eficacia farmacológica de ZIP como inhibidor de PKM ζ . Si bien, ZIP inhibe a PKM ζ , su actividad ha sido demostrada principalmente *in vitro* [115, 166, 209], problema que deja una incógnita respecto a la eficacia farmacológica *in vivo* [210]. Al

respecto, los trabajos en los ratones KO de PKM ζ muestran que la infusión de ZIP, genera el mismo efecto que lo observado en ratones silvestres, poniendo en duda la acción de ZIP. Sin embargo, en ambos trabajos, se deja de lado la participación y/o efecto compensatorio del otro miembro de PKC atípicas, que es PKC ι/λ . En este sentido, ZIP también se une a la región catalítica de PKC ι/λ , por lo que podría actuar como un inhibidor de PKC ι/λ , lo que podría explicar lo observado en los ratones KO. En ese sentido, recientemente se ha reportado que PKC ι/λ es requerida para la mantención del LTP hipocampal [211] (comentario en [212]), poniendo a esta quinasa como un regulador de la plasticidad neuronal. Hasta la fecha poco se sabe de la función de PKC ι/λ en cerebro, por lo que estos hallazgos abren una nueva ventana en el estudio de los fenómenos plásticos que subyacen al aprendizaje y memoria.

V. CONCLUSIONES Y DIRECCIONES FUTURAS

En esta tesis encontramos que los miembros atípicos de la superfamilia de PKC, PKC ζ y PKM ζ , se expresan en el VTA de rata. Nuestros resultados muestran que existiría una distribución homogénea de PKM ζ a lo largo del VTA.

Además, encontramos que tanto el mensajero como la proteína de PKM ζ no cambian sus niveles de expresión luego del tratamiento repetido con el psicoestimulante anfetamina. Encontramos que una sola dosis de anfetamina genera una disminución en el mensajero de PKM ζ lo que podría deberse a una adaptación homeostática.

Al evaluar la actividad de PKM ζ , encontramos que aumenta el grado de fosforilación luego del tratamiento repetido con anfetamina, lo que corresponde a una medida indirecta de un aumento en la actividad. Determinamos la actividad *in vitro*, y este aumento en la actividad fue evaluado *in vivo* mediante la infusión de ZIP directamente en VTA.

La inhibición de PKC ζ /PKM ζ en VTA genera una reducción en la búsqueda de anfetamina. Además, demostramos que este efecto no solo se observa con una droga de abuso, sino que también, obtenemos el mismo tipo de comportamiento cuando utilizamos un recompensante natural como la comida. Estos resultados sugieren que PKC ζ /PKM ζ en VTA es requerida para las conductas motivadas, independiente de cual sea el estímulo recompensante.

Además, nuestros resultados sugieren que la actividad de PKC ζ /PKM ζ es necesaria para la liberación de dopamina en NAcc, inducida por el ambiente asociado al recompensante.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que PKC ζ /PKM ζ , al contrario de lo reportado para otras áreas cerebrales, no participaría en la mantención de la memoria asociativa en VTA, sino que más bien, tendría un papel fundamental en la actividad de esta área en las conductas motivadas.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten sugerir que PKC ζ /PKM ζ cumple un papel en la función del VTA y es requerida para el comportamiento adquirido luego del entrenamiento basado en recompensas. Sería interesante evaluar los blancos moleculares de PKM ζ /PKM ζ en VTA que le permiten controlar la liberación de dopamina en las regiones blanco. El trabajo futuro en este sentido es determinar si la actividad de PKC ζ /PKM ζ controla el proceso de liberación de neurotransmisor o está regulando la excitabilidad de la neurona dopaminérgica, u otra neurona que controle la actividad de la neurona dopaminérgica. Paralelamente, sería interesante realizar ensayos de aplicación exógena de dopamina en el NAcc para recuperar la conducta aprendida en ratas que han sido infundidas con ZIP.

Por otra parte, los resultados obtenidos sobre la abundante expresión de PKM ζ en VTA, su distribución homogénea a lo largo del VTA y la ausencia de cambios luego de los entrenamientos con recompensantes, sugiere que el promotor de PKM ζ en VTA está siendo utilizado continuamente y estaría siendo controlado por factores que se expresan en todo el VTA. Sería interesante evaluar si el promotor de PKM ζ , localizado en el intrón 4 del gen de PKC ζ , está siendo controlado por factores de transcripción relevantes para el VTA, como los

son los factores de la familia Nurr. Además, queda aún por determinar la importancia biológica de la expresión de ambas isoformas de PKC ζ en VTA.

Finalmente, es tentador especular que la modulación de la actividad de PKC ζ /PKM ζ podría ser un mecanismo clave para el control de la función del VTA. Sin embargo, para ello es necesario desarrollar técnicas que permitan una regulación más fina de la actividad de la quinasa, distintas de la inhibición farmacológica con el péptido ZIP.

REFERENCIAS:

1. Morris, E.K., N.G. Smith, and D.E. Altus, *B. F. Skinner's contributions to applied behavior analysis*. Behav Anal, 2005. **28**(2): p. 99-131.
2. Olds, J., *Self-stimulation of the brain; its use to study local effects of hunger, sex, and drugs*. Science, 1958. **127**(3294): p. 315-24.
3. Hyman, S.E., R.C. Malenka, and E.J. Nestler, *Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory*. Annu Rev Neurosci, 2006. **29**: p. 565-98.
4. Olds, J., *Effects of hunger and male sex hormone on self-stimulation of the brain*. J Comp Physiol Psychol, 1958. **51**(3): p. 320-4.
5. Olds, J., *Satiation effects in self-stimulation of the brain*. J Comp Physiol Psychol, 1958. **51**(6): p. 675-8.
6. Routtenberg, A. and C. Malsbury, *Brainstem pathways of reward*. J Comp Physiol Psychol, 1969. **68**(1): p. 22-30.
7. Kelley, A.E. and K.C. Berridge, *The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs*. J Neurosci, 2002. **22**(9): p. 3306-11.
8. Luscher, C. and R.C. Malenka, *Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling*. Neuron, 2011. **69**(4): p. 650-63.
9. Ikemoto, S., *Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex*. Brain Res Rev, 2007. **56**(1): p. 27-78.
10. Nakamura, K. and T. Ono, *Lateral hypothalamus neuron involvement in integration of natural and artificial rewards and cue signals*. J Neurophysiol, 1986. **55**(1): p. 163-81.
11. Harris, G.C., M. Wimmer, and G. Aston-Jones, *A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 556-9.
12. Aston-Jones, G., et al., *Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction*. Brain Res, 2010. **1314**: p. 74-90.
13. Cazala, P., et al., *Differential involvement of the lateral and medial divisions of the septal area on spatial learning processes as revealed by intracranial self-administration of morphine in mice*. Behav Brain Res, 1998. **97**(1-2): p. 179-88.
14. Everitt, B.J., et al., *The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes*. Neuroscience, 1991. **42**(1): p. 1-18.
15. Baxter, M.G. and E.A. Murray, *The amygdala and reward*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(7): p. 563-73.
16. Murray, E.A., *The amygdala, reward and emotion*. Trends Cogn Sci, 2007. **11**(11): p. 489-97.
17. Luo, A.H., et al., *Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area*. Science, 2011. **333**(6040): p. 353-7.

18. Naqvi, N.H. and A. Bechara, *The insula and drug addiction: an interoceptive view of pleasure, urges, and decision-making*. Brain Struct Funct, 2010. **214**(5-6): p. 435-50.
19. Hasue, R.H. and S.J. Shammah-Lagnado, *Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat*. J Comp Neurol, 2002. **454**(1): p. 15-33.
20. Albanese, A. and D. Minciacchi, *Organization of the ascending projections from the ventral tegmental area: a multiple fluorescent retrograde tracer study in the rat*. J Comp Neurol, 1983. **216**(4): p. 406-20.
21. Johnson, S.W. and R.A. North, *Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs*. J Physiol, 1992. **450**: p. 455-68.
22. Rodd-Henricks, Z.A., et al., *Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats*. Psychopharmacology (Berl), 2000. **149**(3): p. 217-24.
23. Yamaguchi, T., W. Sheen, and M. Morales, *Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(1): p. 106-18.
24. Berridge, K.C. and T.E. Robinson, *What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?* Brain Res Brain Res Rev, 1998. **28**(3): p. 309-69.
25. Schultz, W., *Predictive reward signal of dopamine neurons*. J Neurophysiol, 1998. **80**(1): p. 1-27.
26. Corrigall, W.A., et al., *The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine*. Psychopharmacology (Berl), 1992. **107**(2-3): p. 285-9.
27. Rodd, Z.A., et al., *Intracranial self-administration of cocaine within the posterior ventral tegmental area of Wistar rats: evidence for involvement of serotonin-3 receptors and dopamine neurons*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **313**(1): p. 134-45.
28. Ikemoto, S., M. Qin, and Z.H. Liu, *Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area*. J Neurosci, 2006. **26**(3): p. 723-30.
29. Zangen, A., et al., *Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorphin-1: anteroposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens*. J Neurosci, 2002. **22**(16): p. 7225-33.
30. Zangen, A., et al., *Two brain sites for cannabinoid reward*. J Neurosci, 2006. **26**(18): p. 4901-7.
31. Rodd, Z.A., et al., *Intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of male Wistar rats: evidence for involvement of dopamine neurons*. J Neurosci, 2004. **24**(5): p. 1050-7.
32. Carlezon, W.A., Jr., et al., *Distinct sites of opiate reward and aversion within the midbrain identified using a herpes simplex virus vector expressing GluR1*. J Neurosci, 2000. **20**(5): p. RC62.
33. Bolanos, C.A., et al., *Phospholipase Cgamma in distinct regions of the ventral tegmental area differentially modulates mood-related behaviors*. J Neurosci, 2003. **23**(20): p. 7569-76.

34. Olson, V.G., et al., *Regulation of drug reward by cAMP response element-binding protein: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area.* J Neurosci, 2005. **25**(23): p. 5553-62.
35. Mansour, A., et al., *Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS.* J Chem Neuroanat, 1995. **8**(4): p. 283-305.
36. Carlezon, W.A., Jr. and E.J. Nestler, *Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse?* Trends Neurosci, 2002. **25**(12): p. 610-5.
37. Eisch, A.J., et al., *Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression.* Biol Psychiatry, 2003. **54**(10): p. 994-1005.
38. Shabat-Simon, M., et al., *Dissociation between rewarding and psychomotor effects of opiates: differential roles for glutamate receptors within anterior and posterior portions of the ventral tegmental area.* J Neurosci, 2008. **28**(34): p. 8406-16.
39. Brischoux, F., et al., *Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4894-9.
40. Gorelova, N., et al., *The glutamatergic component of the mesocortical pathway emanating from different subregions of the ventral midbrain.* Cereb Cortex, 2012. **22**(2): p. 327-36.
41. Kalivas, P.W., L. Churchill, and M.A. Klitenick, *GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area.* Neuroscience, 1993. **57**(4): p. 1047-60.
42. Swanson, L.W., *The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat.* Brain Res Bull, 1982. **9**(1-6): p. 321-53.
43. Grace, A.A. and B.S. Bunney, *The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing.* J Neurosci, 1984. **4**(11): p. 2877-90.
44. Johnson, S.W., V. Seutin, and R.A. North, *Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump.* Science, 1992. **258**(5082): p. 665-7.
45. Chergui, K., et al., *Tonic activation of NMDA receptors causes spontaneous burst discharge of rat midbrain dopamine neurons in vivo.* Eur J Neurosci, 1993. **5**(2): p. 137-44.
46. Murase, S., et al., *Effects of dizocilpine (MK-801) on rat midbrain dopamine cell activity: differential actions on firing pattern related to anatomical localization.* J Neural Transm Gen Sect, 1993. **91**(1): p. 13-25.
47. Geisler, S., et al., *Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat.* J Neurosci, 2007. **27**(21): p. 5730-43.
48. Ikemoto, S. and J. Panksepp, *The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking.* Brain Res Brain Res Rev, 1999. **31**(1): p. 6-41.
49. Brown, H.D., et al., *Primary food reward and reward-predictive stimuli evoke different patterns of phasic dopamine signaling throughout the striatum.* Eur J Neurosci. **34**(12): p. 1997-2006.

50. Carlezon, W.A., Jr., D.P. Devine, and R.A. Wise, *Habit-forming actions of nomifensine in nucleus accumbens*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1995. **122**(2): p. 194-7.
51. Ikemoto, S., et al., *Role of dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens in mediating reward*. *J Neurosci*, 1997. **17**(21): p. 8580-7.
52. Rodd-Henricks, Z.A., et al., *Cocaine is self-administered into the shell but not the core of the nucleus accumbens of Wistar rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **303**(3): p. 1216-26.
53. Schmidt, H.D., S.M. Anderson, and R.C. Pierce, *Stimulation of D1-like or D2 dopamine receptors in the shell, but not the core, of the nucleus accumbens reinstates cocaine-seeking behaviour in the rat*. *Eur J Neurosci*, 2006. **23**(1): p. 219-28.
54. Ikemoto, S., M. Qin, and Z.H. Liu, *The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: is the division of the accumbens core, shell, and olfactory tubercle valid?* *J Neurosci*, 2005. **25**(20): p. 5061-5.
55. Fenu, S., et al., *Morphine-conditioned single-trial place preference: role of nucleus accumbens shell dopamine receptors in acquisition, but not expression*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2006. **187**(2): p. 143-53.
56. Spina, L., et al., *Nicotine-conditioned single-trial place preference: selective role of nucleus accumbens shell dopamine D1 receptors in acquisition*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2006. **184**(3-4): p. 447-55.
57. Grueter, B.A., P.E. Rothwell, and R.C. Malenka, *Integrating synaptic plasticity and striatal circuit function in addiction*. *Curr Opin Neurobiol*, 2012. **22**(3): p. 545-51.
58. O'Donnell, P., et al., *Modulation of cell firing in the nucleus accumbens*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **877**: p. 157-75.
59. Grueter, B.A., G. Brasnjo, and R.C. Malenka, *Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(12): p. 1519-25.
60. Lobo, M.K., et al., *Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward*. *Science*, 2010. **330**(6002): p. 385-90.
61. Korchounov, A., M.F. Meyer, and M. Krasnianski, *Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation*. *J Neural Transm*, 2010. **117**(12): p. 1359-69.
62. Dalley, J.W. and B.J. Everitt, *Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry*. *Semin Cell Dev Biol*, 2009. **20**(4): p. 403-10.
63. Hyman, S.E. and R.C. Malenka, *Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. **2**(10): p. 695-703.
64. Koob, G.F., et al., *Role for the mesocortical dopamine system in the motivating effects of cocaine*. *NIDA Res Monogr*, 1994. **145**: p. 1-18.
65. Palmiter, R.D., *Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1129**: p. 35-46.
66. Kuepper, R., M. Skinbjerg, and A. Abi-Dargham, *The dopamine dysfunction in schizophrenia revisited: new insights into topography and course*. *Handb Exp Pharmacol*, 2012(212): p. 1-26.

67. Lyness, W.H., N.M. Friedle, and K.E. Moore, *Destruction of dopaminergic nerve terminals in nucleus accumbens: effect on d-amphetamine self-administration*. Pharmacol Biochem Behav, 1979. **11**(5): p. 553-6.
68. Roberts, D.C. and G.F. Koob, *Disruption of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 1982. **17**(5): p. 901-4.
69. Caine, S.B. and G.F. Koob, *Effects of dopamine D-1 and D-2 antagonists on cocaine self-administration under different schedules of reinforcement in the rat*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(1): p. 209-18.
70. Caine, S.B. and G.F. Koob, *Effects of mesolimbic dopamine depletion on responding maintained by cocaine and food*. J Exp Anal Behav, 1994. **61**(2): p. 213-21.
71. Gerrits, M.A. and J.M. Van Ree, *Effect of nucleus accumbens dopamine depletion on motivational aspects involved in initiation of cocaine and heroin self-administration in rats*. Brain Res, 1996. **713**(1-2): p. 114-24.
72. Carr, G.D. and N.M. White, *Anatomical disassociation of amphetamine's rewarding and aversive effects: an intracranial microinjection study*. Psychopharmacology (Berl), 1986. **89**(3): p. 340-6.
73. Cannon, C.M. and R.D. Palmiter, *Reward without dopamine*. J Neurosci, 2003. **23**(34): p. 10827-31.
74. Robinson, S., et al., *Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards*. Behav Neurosci, 2005. **119**(1): p. 5-15.
75. Hnasko, T.S., B.N. Sotak, and R.D. Palmiter, *Morphine reward in dopamine-deficient mice*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 854-7.
76. Phillips, A.G., et al., *Increased extracellular dopamine in the nucleus accumbens of the rat elicited by a conditional stimulus for food: an electrochemical study*. Can J Physiol Pharmacol, 1993. **71**(5-6): p. 387-93.
77. Phillips, M.I. and J. Olds, *Unit activity: motivation-dependent responses from midbrain neurons*. Science, 1969. **165**(3899): p. 1269-71.
78. Tsai, H.C., et al., *Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1080-4.
79. Ito, R., T.W. Robbins, and B.J. Everitt, *Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell*. Nat Neurosci, 2004. **7**(4): p. 389-97.
80. Bromberg-Martin, E.S., M. Matsumoto, and O. Hikosaka, *Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting*. Neuron, 2010. **68**(5): p. 815-34.
81. Montague, P.R., et al., *Dynamic gain control of dopamine delivery in freely moving animals*. J Neurosci, 2004. **24**(7): p. 1754-9.
82. Hollerman, J.R. and W. Schultz, *Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning*. Nat Neurosci, 1998. **1**(4): p. 304-9.
83. Bassareo, V. and G. Di Chiara, *Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments*. Neuroscience, 1999. **89**(3): p. 637-41.
84. Fiorino, D.F., A. Coury, and A.G. Phillips, *Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the Coolidge effect in male rats*. J Neurosci, 1997. **17**(12): p. 4849-55.

85. Berridge, C.W., *Neural substrates of psychostimulant-induced arousal*. Neuropsychopharmacology, 2006. **31**(11): p. 2332-40.
86. Johnson, S.W. and R.A. North, *Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons*. J Neurosci, 1992. **12**(2): p. 483-8.
87. Nestler, E.J. and R.C. Malenka, *The addicted brain*. Sci Am, 2004. **290**(3): p. 78-85.
88. Di Chiara, G. and A. Imperato, *Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5274-8.
89. Nestler, E.J., *Is there a common molecular pathway for addiction?* Nat Neurosci, 2005. **8**(11): p. 1445-9.
90. Fuentealba, J.A., et al., *Repeated administration of the selective kappa-opioid receptor agonist U-69593 increases stimulated dopamine extracellular levels in the rat nucleus accumbens*. J Neurosci Res, 2006. **84**(2): p. 450-9.
91. Beuming, T., et al., *The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap*. Nat Neurosci, 2008. **11**(7): p. 780-9.
92. Fleckenstein, A.E., et al., *New insights into the mechanism of action of amphetamines*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 681-98.
93. Suzdak, P.D., et al., *Ethanol stimulates gamma-aminobutyric acid receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneuroosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 4071-5.
94. Allgaier, C., *Ethanol sensitivity of NMDA receptors*. Neurochem Int, 2002. **41**(6): p. 377-82.
95. Pidoplichko, V.I., et al., *Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons*. Nature, 1997. **390**(6658): p. 401-4.
96. Fattore, L., et al., *Bidirectional regulation of mu-opioid and CB1-cannabinoid receptor in rats self-administering heroin or WIN 55,212-2*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(7): p. 2191-200.
97. Nestler, E.J., *Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(4): p. 210-8.
98. Koob, G.F. and N.D. Volkow, *Neurocircuitry of addiction*. Neuropsychopharmacology, 2010. **35**(1): p. 217-38.
99. Kauer, J.A. and R.C. Malenka, *Synaptic plasticity and addiction*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(11): p. 844-58.
100. Bechara, A., *Decision making, impulse control and loss of willpower to resist drugs: a neurocognitive perspective*. Nat Neurosci, 2005. **8**(11): p. 1458-63.
101. Nestler, E.J. and G.K. Aghajanian, *Molecular and cellular basis of addiction*. Science, 1997. **278**(5335): p. 58-63.
102. Harris, G.C. and G. Aston-Jones, *Critical role for ventral tegmental glutamate in preference for a cocaine-conditioned environment*. Neuropsychopharmacology, 2003. **28**(1): p. 73-6.
103. Mameli, M. and C. Luscher, *Synaptic plasticity and addiction: learning mechanisms gone awry*. Neuropharmacology, 2011. **61**(7): p. 1052-9.
104. Saal, D., et al., *Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons*. Neuron, 2003. **37**(4): p. 577-82.

105. Ungless, M.A., et al., *Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons*. *Nature*, 2001. **411**(6837): p. 583-7.
106. Chen, B.T., et al., *Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA*. *Neuron*, 2008. **59**(2): p. 288-97.
107. Jones, S., J.L. Kornblum, and J.A. Kauer, *Amphetamine blocks long-term synaptic depression in the ventral tegmental area*. *J Neurosci*, 2000. **20**(15): p. 5575-80.
108. Paladini, C.A., et al., *Amphetamine selectively blocks inhibitory glutamate transmission in dopamine neurons*. *Nat Neurosci*, 2001. **4**(3): p. 275-81.
109. Russo, S.J., et al., *The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens*. *Trends Neurosci*, 2010. **33**(6): p. 267-76.
110. Kopnisky, K.L. and S.E. Hyman, *Molecular and Cellular Biology of addiction*, in *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress: An Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, K.L. Davis, Editor. 2002, Lippincott Williams & Wilkins. p. 1367-1379.
111. Hope, B., et al., *Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(13): p. 5764-8.
112. Nguyen, T.V., et al., *Differential expression of c-fos and zif268 in rat striatum after haloperidol, clozapine, and amphetamine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(10): p. 4270-4.
113. Pitchers, K.K., et al., *Natural and drug rewards act on common neural plasticity mechanisms with DeltaFosB as a key mediator*. *J Neurosci*, 2013. **33**(8): p. 3434-42.
114. Malenka, R.C. and M.F. Bear, *LTP and LTD: an embarrassment of riches*. *Neuron*, 2004. **44**(1): p. 5-21.
115. Ling, D.S., et al., *Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance*. *Nat Neurosci*, 2002. **5**(4): p. 295-6.
116. Sacktor, T.C., et al., *Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(18): p. 8342-6.
117. Sacktor, T.C., *How does PKMzeta maintain long-term memory?* *Nat Rev Neurosci*, 2011. **12**(1): p. 9-15.
118. Pastalkova, E., et al., *Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP*. *Science*, 2006. **313**(5790): p. 1141-4.
119. Madronal, N., et al., *PKMzeta inhibition reverses learning-induced increases in hippocampal synaptic strength and memory during trace eyeblink conditioning*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10400.
120. Ling, D.S., L.S. Benardo, and T.C. Sacktor, *Protein kinase Mzeta enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors*. *Hippocampus*, 2006. **16**(5): p. 443-52.
121. Sacktor, T.C., *PKMzeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage*. *Prog Brain Res*, 2008. **169**: p. 27-40.
122. Yao, Y., et al., *PKM zeta maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors*. *J Neurosci*, 2008. **28**(31): p. 7820-7.

123. Barry, J.M., et al., *Inhibition of protein kinase Mzeta disrupts the stable spatial discharge of hippocampal place cells in a familiar environment*. J Neurosci, 2012. **32**(40): p. 13753-62.
124. Shema, R., T.C. Sacktor, and Y. Dudai, *Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta*. Science, 2007. **317**(5840): p. 951-3.
125. Shema, R., et al., *Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase Mzeta in the neocortex*. Science, 2011. **331**(6021): p. 1207-10.
126. Serrano, P., et al., *PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories*. PLoS Biol, 2008. **6**(12): p. 2698-706.
127. Li, X.Y., et al., *Alleviating neuropathic pain hypersensitivity by inhibiting PKMzeta in the anterior cingulate cortex*. Science, 2010. **330**(6009): p. 1400-4.
128. Daw, M.I., et al., *PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses*. Neuron, 2000. **28**(3): p. 873-86.
129. Kwapis, J.L., et al., *Protein kinase Mzeta maintains fear memory in the amygdala but not in the hippocampus*. Behav Neurosci, 2009. **123**(4): p. 844-50.
130. Kwapis, J.L., et al., *Intra-amygdala infusion of the protein kinase Mzeta inhibitor ZIP disrupts foreground context fear memory*. Neurobiol Learn Mem, 2012. **98**(2): p. 148-53.
131. Miguez, P.V., et al., *PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking*. Nat Neurosci, 2010. **13**(5): p. 630-4.
132. Li, Y.Q., et al., *Inhibition of PKMzeta in nucleus accumbens core abolishes long-term drug reward memory*. J Neurosci, 2011. **31**(14): p. 5436-46.
133. Song, M.J., et al., *Inhibition of PKMzeta in the nucleus accumbens core blocks the expression of locomotor sensitization induced by amphetamine*. Behav Brain Res, 2013. **241**: p. 139-43.
134. Shabashov, D., E. Shohami, and R. Yaka, *Inactivation of PKMzeta in the NAc shell abolished cocaine-conditioned reward*. J Mol Neurosci, 2012. **47**(3): p. 546-53.
135. Pauli, W.M., et al., *Inhibiting PKMzeta reveals dorsal lateral and dorsal medial striatum store the different memories needed to support adaptive behavior*. Learn Mem, 2012. **19**(7): p. 307-14.
136. Asiedu, M.N., et al., *Spinal protein kinase M zeta underlies the maintenance mechanism of persistent nociceptive sensitization*. J Neurosci, 2011. **31**(18): p. 6646-53.
137. Marchand, F., et al., *Specific involvement of atypical PKCzeta/PKMzeta in spinal persistent nociceptive processing following peripheral inflammation in rat*. Mol Pain, 2011. **7**: p. 86.
138. Laferriere, A., et al., *PKMzeta is essential for spinal plasticity underlying the maintenance of persistent pain*. Mol Pain, 2011. **7**: p. 99.
139. King, T., et al., *Contribution of PKMzeta-dependent and independent amplification to components of experimental neuropathic pain*. Pain, 2012. **153**(6): p. 1263-73.
140. Hernandez, A.I., et al., *Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 40305-16.

141. Muslimov, I.A., et al., *Dendritic transport and localization of protein kinase Mzeta mRNA: implications for molecular memory consolidation*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52613-22.
142. Shao, C.Y., et al., *PKMzeta is necessary and sufficient for synaptic clustering of PSD-95*. Hippocampus, 2012. **22**(7): p. 1501-7.
143. Ron, S., Y. Dudai, and M. Segal, *Overexpression of PKMzeta alters morphology and function of dendritic spines in cultured cortical neurons*. Cereb Cortex, 2012. **22**(11): p. 2519-28.
144. Westmark, P.R., et al., *Pin1 and PKMzeta sequentially control dendritic protein synthesis*. Sci Signal, 2010. **3**(112): p. ra18.
145. Liu, X.F., P.K. Tari, and K. Haas, *PKM zeta restricts dendritic arbor growth by filopodial and branch stabilization within the intact and awake developing brain*. J Neurosci, 2009. **29**(39): p. 12229-35.
146. Serrano, P., Y. Yao, and T.C. Sacktor, *Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta maintains late-phase long-term potentiation*. J Neurosci, 2005. **25**(8): p. 1979-84.
147. Kelly, M.T., J.F. Crary, and T.C. Sacktor, *Regulation of protein kinase Mzeta synthesis by multiple kinases in long-term potentiation*. J Neurosci, 2007. **27**(13): p. 3439-44.
148. Zhang, Y.H., et al., *Nerve growth factor enhances the excitability of rat sensory neurons through activation of the atypical protein kinase C isoform, PKMzeta*. J Neurophysiol, 2012. **107**(1): p. 315-35.
149. Sacktor, T.C., *PINing for things past*. Sci Signal, 2010. **3**(112): p. pe9.
150. Sossin, W.S., T.C. Sacktor, and J.H. Schwartz, *Persistent activation of protein kinase C during the development of long-term facilitation in Aplysia*. Learn Mem, 1994. **1**(3): p. 189-202.
151. Bougie, J.K., et al., *The atypical protein kinase C in Aplysia can form a protein kinase M by cleavage*. J Neurochem, 2009. **109**(4): p. 1129-43.
152. Cai, D., et al., *Protein kinase M maintains long-term sensitization and long-term facilitation in aplysia*. J Neurosci, 2011. **31**(17): p. 6421-31.
153. Sacktor, T.C., *Memory maintenance by PKMzeta--an evolutionary perspective*. Mol Brain, 2012. **5**: p. 31.
154. Drier, E.A., et al., *Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in Drosophila melanogaster*. Nat Neurosci, 2002. **5**(4): p. 316-24.
155. Paxinos, G. and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Sixth Edition*. 2007.
156. Blanco, E., et al., *Intron retention as an alternative splice variant of the rat urocortin 1 gene*. Neuroscience, 2006. **140**(4): p. 1245-52.
157. Bustos, G., et al., *NMDA receptors mediate an early up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in substantia nigra in a rat model of presymptomatic Parkinson's disease*. J Neurosci Res, 2009. **87**(10): p. 2308-18.
158. Hayashi, T., et al., *Quantitative analyses of matrix metalloproteinase activity after traumatic brain injury in adult rats*. Brain Res, 2009. **1280**: p. 172-7.
159. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.

160. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
161. Andres, M.E., et al., *NMDA-NR1 receptor subunit mRNA expression in rat brain after 6-OH-dopamine induced lesions: a non-isotopic in situ hybridization study*. J Neurosci Res, 1996. **46**(3): p. 375-84.
162. Roux, S., et al., *Place preference test in rodents*. Curr Protoc Neurosci, 2003. **Chapter 9**: p. Unit 9 15.
163. Contreras, M., F. Ceric, and F. Torrealba, *Inactivation of the interoceptive insula disrupts drug craving and malaise induced by lithium*. Science, 2007. **318**(5850): p. 655-8.
164. Peterson, R.T. and S.L. Schreiber, *Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family*. Curr Biol, 1999. **9**(14): p. R521-4.
165. Balendran, A., et al., *A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase C ζ (PKC ζ) and PKC-related kinase 2 by PDK1*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20806-13.
166. Laudanna, C., et al., *Evidence of zeta protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30306-15.
167. Nelson, A.R., et al., *Myristoyl-based transport of peptides into living cells*. Biochemistry, 2007. **46**(51): p. 14771-81.
168. Yao, Y., et al., *Matching biochemical and functional efficacies confirm ZIP as a potent competitive inhibitor of PKM ζ in neurons*. Neuropharmacology, 2012. **64**: p. 37-44.
169. Conrad, K.L., et al., *Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving*. Nature, 2008. **454**(7200): p. 118-21.
170. Ferrario, C.R., et al., *Alterations in AMPA receptor subunits and TARPs in the rat nucleus accumbens related to the formation of Ca(2)(+)-permeable AMPA receptors during the incubation of cocaine craving*. Neuropharmacology, 2011. **61**(7): p. 1141-51.
171. Wolf, M.E. and K.Y. Tseng, *Calcium-permeable AMPA receptors in the VTA and nucleus accumbens after cocaine exposure: when, how, and why?* Front Mol Neurosci, 2012. **5**: p. 72.
172. Bourdy, R. and M. Barrot, *A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail*. Trends Neurosci, 2012. **35**(11): p. 681-90.
173. Tan, K.R., et al., *GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion*. Neuron, 2012. **73**(6): p. 1173-83.
174. Carr, D.B. and S.R. Sesack, *GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex*. Synapse, 2000. **38**(2): p. 114-23.
175. Chuhma, N., et al., *Dopamine neurons mediate a fast excitatory signal via their glutamatergic synapses*. J Neurosci, 2004. **24**(4): p. 972-81.
176. Hnasko, T.S., et al., *Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease in vivo*. Neuron, 2010. **65**(5): p. 643-56.
177. Schultz, W., *Multiple functions of dopamine neurons*. F1000 Biol Rep. **2**.
178. Gysling, K. and R.Y. Wang, *Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat*. Brain Res, 1983. **277**(1): p. 119-27.

179. Higginbotham, H., et al., *GSK3beta and PKCzeta function in centrosome localization and process stabilization during Slit-mediated neuronal repolarization*. Mol Cell Neurosci, 2006. **32**(1-2): p. 118-32.
180. Liu, X.F., X. Xie, and T. Miki, *Inhibition of protein kinase C zeta blocks the attachment of stable microtubules to kinetochores leading to abnormal chromosome alignment*. Cell Signal, 2006. **18**(12): p. 2314-23.
181. Conde, C. and A. Caceres, *Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(5): p. 319-32.
182. Cornford, P., et al., *Protein kinase C isoenzyme patterns characteristically modulated in early prostate cancer*. Am J Pathol, 1999. **154**(1): p. 137-44.
183. Yao, S., et al., *PRKC-zeta Expression Promotes the Aggressive Phenotype of Human Prostate Cancer Cells and Is a Novel Target for Therapeutic Intervention*. Genes Cancer, 2010. **1**(5): p. 444-64.
184. Velazquez-Garcia, S., et al., *Activation of protein kinase C-zeta in pancreatic beta-cells in vivo improves glucose tolerance and induces beta-cell expansion via mTOR activation*. Diabetes, 2011. **60**(10): p. 2546-59.
185. Wang, W., et al., *6-Hydroxydopamine upregulates iron regulatory protein 1 by activating certain protein kinase C isoforms in the dopaminergic MES23.5 cell line*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(11): p. 1987-1992.
186. Thaler, J.P., et al., *Atypical protein kinase C activity in the hypothalamus is required for lipopolysaccharide-mediated sickness responses*. Endocrinology, 2009. **150**(12): p. 5362-72.
187. Newton, A.C., *Regulation of protein kinase C*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 161-7.
188. Shema, R., et al., *Boundary conditions for the maintenance of memory by PKMzeta in neocortex*. Learn Mem, 2009. **16**(2): p. 122-8.
189. von Kraus, L.M., T.C. Sacktor, and J.T. Francis, *Erasing sensorimotor memories via PKMzeta inhibition*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11125.
190. Russo, S.J., et al., *IRS2-Akt pathway in midbrain dopamine neurons regulates behavioral and cellular responses to opiates*. Nat Neurosci, 2007. **10**(1): p. 93-9.
191. He, Y.Y., et al., *PKMzeta maintains drug reward and aversion memory in the basolateral amygdala and extinction memory in the infralimbic cortex*. Neuropsychopharmacology, 2011. **36**(10): p. 1972-81.
192. Crespo, J.A., et al., *Activation of PKCzeta and PKMzeta in the nucleus accumbens core is necessary for the retrieval, consolidation and reconsolidation of drug memory*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30502.
193. Ho, S.Y., et al., *Protein kinase mzeta is necessary for cocaine-induced synaptic potentiation in the ventral tegmental area*. Biol Psychiatry, 2012. **71**(8): p. 706-13.
194. Parsons, R.G. and M. Davis, *Temporary disruption of fear-potentiated startle following PKMzeta inhibition in the amygdala*. Nat Neurosci, 2011. **14**(3): p. 295-6.
195. Dunkley, P.R., et al., *Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences*. J Neurochem, 2004. **91**(5): p. 1025-43.
196. Bobrovskaya, L., et al., *Sustained phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40: a novel mechanism for maintenance of catecholamine synthesis*. J Neurochem, 2007. **100**(2): p. 479-89.

197. Liang, J., et al., *Dynamic changes of tyrosine hydroxylase and dopamine concentrations in the ventral tegmental area-nucleus accumbens projection during the expression of morphine-induced conditioned place preference in rats.* *Neurochem Res*, 2012. **37**(7): p. 1482-9.
198. Ren, Y., et al., *Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization.* *J Biol Chem*, 2005. **280**(40): p. 34105-12.
199. Cohen, E.E., et al., *Protein kinase C zeta mediates epidermal growth factor-induced growth of head and neck tumor cells by regulating mitogen-activated protein kinase.* *Cancer Res*, 2006. **66**(12): p. 6296-303.
200. Powell, D.J., et al., *Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism.* *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(21): p. 7794-808.
201. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links.* *Cell*, 2012. **148**(5): p. 852-71.
202. Mendez, R., et al., *Requirement of protein kinase C zeta for stimulation of protein synthesis by insulin.* *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(9): p. 5184-92.
203. Ravichandran, L.V., et al., *Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin.* *J Biol Chem*, 2001. **276**(5): p. 3543-9.
204. Figlewicz, D.P., et al., *Insulin acts at different CNS sites to decrease acute sucrose intake and sucrose self-administration in rats.* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008. **295**(2): p. R388-94.
205. Labouebe, G., et al., *Insulin induces long-term depression of ventral tegmental area dopamine neurons via endocannabinoids.* *Nat Neurosci*, 2013. **16**(3): p. 300-8.
206. Iniguez, S.D., et al., *Insulin receptor substrate-2 in the ventral tegmental area regulates behavioral responses to cocaine.* *Behav Neurosci*, 2008. **122**(5): p. 1172-7.
207. Lee, A.M., et al., *Prkcz null mice show normal learning and memory.* *Nature*, 2013. **493**(7432): p. 416-9.
208. Volk, L.J., et al., *PKM-zeta is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory.* *Nature*, 2013. **493**(7432): p. 420-3.
209. Yao, Y., et al., *Matching biochemical and functional efficacies confirm ZIP as a potent competitive inhibitor of PKMzeta in neurons.* *Neuropharmacology*, 2013. **64**: p. 37-44.
210. Lisman, J., *Memory erasure by very high concentrations of ZIP may not be due to PKM-zeta.* *Hippocampus*, 2012. **22**(3): p. 648-9.
211. Ren, S.Q., et al., *PKClambda is critical in AMPA receptor phosphorylation and synaptic incorporation during LTP.* *EMBO J*, 2013. **32**(10): p. 1365-80.
212. Matt, L. and J.W. Hell, *PKClambda: a new player in LTP coming to the rescue of PKCzeta's faltering role in LTP?* *EMBO J*, 2013. **32**(10): p. 1348-9.