

## PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

Facultad de Ciencias Biológicas Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Mención Biología Celular y Molecular

## INTERACCION MOLECULAR DE LOS RECEPTORES CRH-R<sub>2</sub> Y DA-D<sub>1</sub> EN EL AREA TEGMENTAL VENTRAL DE RATA

Por

## KATHERINE ANGELICA ARAYA GUTIERREZ

Septiembre 2013



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

# INTERACCION MOLECULAR DE LOS RECEPTORES CRH- $R_2$ Y DA- $D_1$ EN EL AREA TEGMENTAL VENTRAL DE RATA

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

Por

## KATHERINE ANGÉLICA ARAYA GUTIÉRREZ

Director de Tesis: Katia Gysling Caselli

Comisión de Tesis: Dra. Jimena Sierralta Dr. Alfonso González Dr. Juan Pablo García-Huidobro

Septiembre 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:

## INTERACCION MOLECULAR DE LOS RECEPTORES CRH-R2 Y DA-D1 EN EL AREA TEGMENTAL VENTRAL DE RATA

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

## KATHERINE ANGELICA ARAYA GUTIERREZ

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. Dra. Katia Gysling Director de Tesis Facultad de Ciencias Biológicas

Prof. Dra. Jimena Sierralta Profesor Invitado Facultad de Medicina, U. de Chile

Prof. Dr. Juan Pablo García Huidobro Miembro Comisión de Tesis Facultad de Ciencias Biológicas Prof. Dra. Alejandra Alvarez Jefa de Mención Facultad de Ciencias Biológicas

Prof. Dr. Alfonso González Miembro Comisión de Tesis Facultad de Ciencias Biológicas

Santiago de Chile, Septiembre de 2013

#### • Desarrollo experimental de tesis:

- Beca de apoyo de tesis doctoral CONICYT (2009-2010)
- Iniciativa científica Milenio (ICM) Nº 06M/008-F
- FONDECYT Nº 1070340 y 7080124
- Beca para estudio de Doctorado:
- Beca instructor becario VRI (2011)
- Beca CONICYT para estudios de doctorado en Chile (marzo 2008 a febrero 2011)
- Beca VRAID para estudios de doctorado en Chile (2007)

### • Becas asistencia a congresos nacionales e internacionales:

- Beca CONICYT para asistencia a congresos nacional (2008 y 2009)
- Becas para asistencia a congreso internacional de la Sociedad Chilena de Neurociencia (2008)
- Beca Society for Neuroscience Chapters Graduate Student Travel Awards (2010)
- Beca CONICYT asistencia a congreso internacional y cursos cortos (2010)
- Beca VRAID asistencia a congreso internacional (2010)

#### • Becas estadía en el extranjero:

- Travel Grants/ Short Stays-IBRO LARC (2010)
- Travel Grants/ Visit by the Applicant to Another Laboratory to the Committee for Aid and Education in Neurochemistry (CAEN) (2010)
- Beca CONICYT de Gestión Propia para Pasantías en el Extranjero de Estudiantes de Doctorado (Research stay Universitat de Barcelona) (2008)

Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a todos quienes directa o indirectamente con su ayuda, apoyo y compresión me alentaron a terminar esta tesis.

Muchísimas gracias

INDICE DE MATERIAS
--------------------

NDICE DE FIGURAS	
INDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCION	
1.1. Adicción y sus características	1
1.2. El área tegmental ventral, centro del circuito de la recompensa o de la motivación	2
1.3. Antecedentes para la hipótesis	7
1.4. Hipótesis y objetivos	
1.4.1 Hipótesis	14
1.4.2 Objetivo general	14
1.4.2 Objetivos específicos	14
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Animales	15
2.2. Preferencia de lugar condicionada	15
2.3. Microdiálisis <i>in vivo</i>	16
2.4. Análisis de las muestras de microdiálisis	17
2.5. Preparación de sinaptosomas de cerebro de rata	20
2.6. Cuantificación de proteínas	23
2.7. Inmunofluorescencia en sinaptosomas del VTA de rata	23
2.8. Ultraestructura e <i>inmunogold</i> en sinaptosomas del VTA de rata	25
2.8.1. Ultraestructura del VTA y de sinaptosomas del VTA de rata	25
2.8.2. Inmunogold de sinaptosomas de VTA de rata	26
2.9. Western Blot en sinaptosomas de VTA de rata	27
2.10. <i>Crosslink</i> de sinaptosomas del VTA de rata	28

2.11. Co-inmunoprecipitación en sinaptosomas del VTA de rata	29
2.12. Cultivos celulares	
2.13. Clonamientos de receptores DA-D <sub>1</sub> y CRH-R <sub>2</sub>	31
2.14. Transfección de células HEK293T	
2.14.1. Fluorescencia e Inmunofluorescencia en células HEK293T	
2.14.2. Transferencia de energía por resonancia	
2.14.2.1. BRET	
2.14.2.2. FRET/FRAP	
2.15. Análisis estadístico	37
3. RESULTADOS	
3.1. Determinación de la interacción funcional entre los receptores de CRH-R <sub>2</sub> y DA-D	₀₁ en el VTA de
ratas tratadas con cocaína	39
3.1.1. Preferencia de lugar condicionado (CPP)	
3.1.2. Niveles extracelulares de glutamato, DA y GABA en el VTA de ratas controles y	γ ratas tratadas
con cocaína, inducidos por la perfusión intra-VTA de CRH	
3.1.3. Niveles extracelulares de glutamato y DA en el VTA inducidos por la perfusió	n intra-VTA de
SKF38392 o SKF83822 en ratas controles y ratas tratadas con cocaína	49
3.1.4. Cambios neuroquímicos en el VTA inducidos por la perfusión intra-VTA de CR	H + SKF38392
o CRH + SKF3822 en ratas controles y ratas tratadas con cocaína	
3.2. Determinación de la localización de los receptores de CRH-R $_2$ y DA-D $_1$ en el	VTA de ratas
controles y en ratas tratadas repetidamente con cocaína	57
3.3. Interacción física o molecular entre los receptores de CRH-R <sub>2</sub> y DA-D <sub>1</sub>	71
3.3.1. Experimentos de Co-inmunoprecipitación	
3.3.2. Interacción BRET y FRET/FRAP	
4. DISCUSION	
5. CONCLUSIONES	90
6. REFERENCIAS	91

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Anatomía del VTA de rata	3
Figura 2. Localización de la sonda de microdiálisis en el VTA de rata	19
Figura 3. Preferencia de lugar condicionado a cocaína	41
Figura 4. La perfusión intra VTA de CRH aumentó los niveles de glutamato, DA y GABA sólo en	el VTA
de ratas tratadas con cocaína.	44
Figura 5. La perfusión intra-VTA de K41498, antagonista de los receptores CRH-R2, bloquea el au	umento
de glutamato y de DA inducido por CRH en el VTA de ratas tratadas con cocaína	47
Figura 6. la perfusión intra VTA de SCH23390, antagonista de los receptores DA-D1, bloq	uea el
aumento de glutamato y de DA inducido por CRH en el VTA de ratas tratadas con cocaína	48
Figura 7. La perfusión intra VTA de SKF38392 o SKF83822, agonistas de los receptores I	DA-D1,
aumentó los niveles extracelulares solo de glutamato en el VTA de ratas tratadas con cocaína	51
Figura 8. La perfusión intra VTA de los antagonistas SCH23390 o K41498 bloquea el aumento	en los
niveles extracelulares de glutamato inducidos por SKF38392 o SKF83822 en el VTA de ratas tr	atadas
con cocaína	52
Figura 9. Efecto de la perfusión intra-VTA de CRH+SKF38392 o CRH+SKF83822 sobre los	niveles
extracelulares de glutamato y DA en el VTA de ratas controles y ratas tratadas con cocaína	55
Figura 10. La perfusión intra VTA de SCH23390 o K41498 bloqueó el aumento en los nive	eles de
glutamato y DA inducidos por la perfusión de CRH+SKF38392 o CRH+SKF83822	56
Figura 11. Western Blot en sinaptosomas del Cuerpo estriado de rata	59
Figura 12. Ultra estructura de sinaptosomas del VTA de ratas	60
Figura 13. Detección por microscopia electrónica de los receptores CRH-R2 y DA-D1 en sinapto	somas
del VTA de rata	<u>61</u>
Figura 14. Ultraestructura de VTA de rata	<u>63</u>
Figura 15. Doble inmunofluorescencia en sinaptosomas de VTA de rata	66
Figura 16. Localización de receptores CRH-R <sub>2</sub> en terminales glutamatérgicos del VTA de rata	67
<b>Figura 17</b> . Localización de receptores DA-D <sub>1</sub> en terminales glutamatérgicos del VTA de rata	68

Figura 18. Co-existencia de los receptores de DA-D <sub>1</sub> y CRH-R <sub>2</sub> sinaptosomas del VTA de rata	69
Figura 19. Localización de receptores DA-D <sub>1</sub> y CRH-R <sub>2</sub> en terminales glutamatérgicos subcortica	ales del
VTA de rata	70
Figura 20. Western blot contra receptores de DA-D <sub>1</sub> y CRH-R <sub>2</sub> en sinaptosomas de VTA de rata	73
<b>Figura 21.</b> Interacción entre receptores CRH-R <sub>2</sub> y DA-D <sub>1</sub> en sinaptosomas del VTA de rata	74
Figura 22 y 23. Interacción de receptores CRH-R <sub>2</sub> y DA-D <sub>1</sub> en células HEK293T	79-80
Figura 24. Eficiencia de interacción entre los receptores CRH-R <sub>2</sub> y DA-D <sub>1</sub> en células HEK293T	

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Agonistas y antagonistas para los receptores DA-D1 y CHR-R2	18
Tabla 2. Preparación de soluciones para el gradiente de Percoll	22
Tabla 3. Construcciones	38

#### RESUMEN

La administración repetida de drogas de abuso genera cambios plásticos perdurables que se traducen en alteraciones en las propiedades funcionales de las neuronas del sistema mesocorticolímbico, como lo es la sensibilización de la liberación de glutamato en el área tegmental ventral (VTA) inducida por la administración repetida de cocaína, esto determina la recaída a la droga (Wang y cols. 2005). Dicha sensibilización estaría siendo modulada por la activación de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> (DA-D<sub>1</sub>) y de los receptores CRH-R<sub>2</sub>. Por otra parte, se ha observado que la administración repetida de cocaína también induce una facilitación de la transmisión glutamatérgica presináptica, en la corteza prefrontal (CPF), dicha facilitación glutamatérgica estaría mediada por la co-activación de receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>, sugiriendo que dichos cambios estarían ocurriendo por uno o más mecanismos como: cooperatividad entre los receptores, vías de señalización en común y/o por la formación de heterómeros de los receptores DA-D1 y CRH-R2. La interacción funcional y/o molecular de receptores metabotrópicos o heterómeros de receptores, ha aportado interesantes hallazgos sobre la regulación de la liberación de glutamato en núcleos del cerebro como el Cuerpo Estriado. En base a estos antecedentes no propusimos estudiar el papel de los receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub> en la sensibilización de la liberación de glutamato en el VTA inducida por la administración repetida de cocaína. Nuestros resultados muestran que existe una interacción funcional entre dichos receptores sólo en las ratas expuestas al tratamiento repetido con cocaína. Con respecto a la localización, hemos determinado que existe un 34,1 % de la población de terminales glutamatérgicos de origen subcortical que poseen receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub>. Finalmente, hemos demostrado por varias técnicas que existe una interacción molecular entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>.

#### ABSTRACT

Repeated administration of drugs of abuse produces enduring plastic changes that result in alterations in the functional properties of neurons in the mesocorticolimbic system, such as the raising of glutamate release in the ventral tegmental area (VTA) induced by repeated administration cocaine, determines the drug relapse. Such sensitization would be modulated by the activation of  $D_1$  dopamine receptors (DA- $D_1$ ) and CRH-R<sub>2</sub> receptors. Moreover, it has been observed that repeated administration of cocaine also induces facilitating presynaptic glutamatergic transmission in the prefrontal cortex (PFC), such facilitation glutamatergic be co-mediated activation of CRH-R<sub>2</sub> receptors and DA-D<sub>1</sub>, suggesting that such changes would be occurring through one or more mechanisms such as receptor: cooperativity, signaling pathways and/or by the formation of heteromers between DA-D<sub>1</sub> and CRH-R<sub>2</sub> receptors. Functional and/or molecular interaction metabotropic receptors, has provided interesting findings regarding the regulation of glutamate release in brain nuclei as the striatum. Based on this background, it set out to study the role of DA-D<sub>1</sub> receptors and CRH-R<sub>2</sub> in the sensitization of glutamate release in the VTA induced by repeated administration of cocaine.

Our results show that there is a functional interaction between these receptors only in rats exposed to repeated treatment with cocaine. With regard to the location, we have determined that there is a 34.1% of the population of glutamatergic terminals of subcortical origin possessing DA-D<sub>1</sub> receptors and CRH-R<sub>2</sub>. Finally, we have demonstrated by various techniques that there is a molecular interaction between the CRH-R<sub>2</sub> receptors and DA-D<sub>1</sub>.

#### 1. INTRODUCCION

#### 1.1. Adicción y sus características

La adicción a drogas o drogadicción es una enfermedad que afecta de forma crónica al cerebro y que se caracteriza por la búsqueda compulsiva de drogas sin importar sus consecuencias adversas. La administración repetida de drogas de abuso genera cambios plásticos perdurables, que se traducen en alteraciones en las propiedades funcionales de las neuronas del sistema mesocorticolímbico, eje del circuito de la recompensa o también llamado circuito de la motivación. Se ha propuesto que estos cambios plásticos son los responsables tanto del consumo compulsivo de la droga como de la alta tasa de recaídas en sujetos adictos, aun después de largos períodos de abstinencia. El fenómeno de las recaídas es uno de los retos más difíciles de resolver en esta enfermedad, ya que no están claros los mecanismos neurobiológicos que llevan a los individuos abstinentes a recaer. Sin embargo, estudios clínicos y preclínicos han permitido identificar 3 estímulos capaces de inducir la recaída, estos son la exposición a: 1) claves ambientales asociadas al consumo de la droga, 2) una dosis baja de la droga misma o de otra droga que induzca experiencias semejantes a la abusada, y 3) estímulos estresantes con impacto emocional. La recaída inducida por estrés es uno de los modelos más utilizados para el estudio de la conducta de restablecimiento de búsqueda de drogas.

# 1.2. El área tegmental ventral, centro del circuito de la recompensa o de la motivación

Desde los estudios pioneros de Olds y Milner (1954), en el cual se identificaron regiones del cerebro que sostenían auto-estimulación eléctrica, se supo de la existencia de un grupo interconectado de núcleos denominado el circuito de la recompensa que determina el refuerzo de los estímulos placenteros.

El área tegmental ventral (VTA) es el núcleo central de este circuito y desempeña un importante rol en la función reforzante, ya sea por efectos de drogas de abuso como por recompensas naturales. El VTA localizado en la parte dorsal del cerebro medio se ha caracterizado por tener una citoarquitectura heterogénea y con límites poco claros para distinguirlo de las regiones adyacentes. Sin embargo, el VTA se ha subdividido en cuatro grandes regiones: núcleo paranigral (PN), área pigmentada parabraquial (PBP), cola tegmental ventral (VTT) y el parafasciculus retroflexus (PR) (revisado en Ikemoto, 2007) (Figura 1A). Por otra parte, el VTA ha sido extensamente caracterizado como una de las principales regiones dopaminérgicas del cerebro, compuesto por un 60% de neuronas dopaminérgicas en comparación con la sustancia nigra compacta (SNc) que posee un 90% de neuronas dopaminérgicas (Margolis y cols, 2006). Las neuronas dopaminérgicas del VTA forman el eje central del circuito proyectando a varios núcleos del cerebro tales como el Núcleo Accumbens (NAc), la corteza prefrontal (CPF), el Septum, la amígdala basolateral (BLA), otras subregiones de la amígdala extendida y el hipotálamo lateral (HL); todos ellos son parte del circuito de la recompensa (Figura 1B).





**Figura 1. Anatomía del VTA de rata. A)** Corte coronal del VTA de rata (Paxinos). **B)** Ampliación del VTA donde se muestra su citoarquitectura la cual se ha subdividido en cuatro grandes regiones: núcleo paranigral (PN), área pigmentada parabraquial (PBP), cola tegmental ventral (VTT) y el *parafasciculus retroflexus* (PR) (descripción realizada por Ikemoto, 2007). **C)** Esquema simplificado de los circuitos del sistema mesolímbico de la dopamina en el cerebro de la rata destacando las principales aferencias al núcleo accumbens (NAC) y al área tegmental ventral (VTA) (proyecciones glutamatérgicas, azules; proyecciones dopaminérgicas, rojas, proyecciones GABAérgicas, naranja, proyecciones orexinérgicas, verde. AMG: Amígdala; BNST: lecho de la estría terminal; LH: hipotálamo lateral; VP: pálido ventral; NAc: Núcleo Accumbens; PFC: corteza prefrontal y LDTg: Tegmento dorsolateral) (Obtenida de Kauer y Malenka, 2007).

Lamel y cols (2008) a través de un exhaustivo estudio, en el cual se combinaron diferentes técnicas anatómicas, electrofisiológicas, inmunohistoquímicas V expresión de mRNA, han confirmado la existencia de dos poblaciones dopaminérgicas del VTA, las cuales proyectan a distintos núcleos del sistema mesocorticolímbico. Por una parte, se observa que existe un grupo de neuronas dopaminérgicas que se originan en la porción posterior medial del VTA y que proyectan a la corteza prefrontal medial (CPFm), y otro grupo originado en la zona más anterior del VTA y que proyectan a NAc shell medial, NAc core y amígdala. Por otro lado, las neuronas dopaminérgicas que proyectan al NAc shell lateral provienen de las porciones más laterales del VTA y también se observó que existe un sobrelapamiento parcial con las células dopaminérgicas de la SNc que proyectan al estriado dorsal. Estos dos grupos de células dopaminérgicas que proyectan a las áreas mesocorticolímbicas varían en sus niveles de expresión de mRNA para los marcadores, tirosina hidroxilasa (TH), transportador de dopamina (DAT) y transportador vesicular de monoaminooxidasas tipo 2 (VMAT<sub>2</sub>). Mediante electrofisiología también se observaron diferencias a nivel funcional (Lamel y cols, 2008).

Cabe señalar que no sólo se ha mostrado la existencia de las neuronas dopaminérgicas en el VTA, sino que también han sido identificadas en el VTA poblaciones de neuronas ácido-γ-aminobutírico (GABA)érgicas (Carr y Sesack, 2000) y más recientemente neuronas glutamatérgicas (Yamaguchi y cols, 2007). La actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA está regulada principalmente por aferencias inhibitorias provenientes de interneuronas GABAérgicas y de

neuronas GABAérgicas ubicadas en el NAc y el Pálido Ventral (Kalivas y cols, 1993); y por aferencias excitatorias glutamatérgicas. Las aferencias glutamatérgicas al VTA se originan en aproximadamente un 20 % desde la CPF, y en un 80 % desde núcleos subcorticales tales como la amígdala extendida, núcleo tegmental laterodorsal, HL y núcleo del pedúnculo pontino (Figura 1B) (Georges y Aston-Jones, 2002; Geisler y cols, 2007; Olmechenko y cols, 2007).

Tanto los reforzantes naturales como las drogas de abuso activan el circuito de la recompensa. Sin embargo, las drogas de abuso lo hacen con mayor intensidad y sin decaer con el uso repetido (Kalivas y O'Brien, 2008). La administración repetida de las distintas drogas de abuso, actuando por diversos mecanismos moleculares, activan las neuronas dopaminérgicas del VTA determinando cambios plásticos perdurables en dichas neuronas comunes a todas las drogas de abuso. Saal y cols (2003) mostraron que 24 horas luego de la administración de distintas drogas de abuso como alcohol, anfetamina, nicotina, morfina y cocaína aumenta la razón entre receptores AMPA y NMDA en las neuronas dopaminérgicas del VTA. El aumento de la razón entre los receptores AMPA y NMDA es una medida del aumento de la eficiencia en la transmisión glutamatérgica que regula la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA. En el mismo trabajo mostraron que 24 horas luego de la exposición a un estímulo estresante también se producen los mismos cambios en la razón entre los receptores AMPA y NMDA, sugiriendo que este cambio es común a drogas de abuso y a estrés. Una de las características de las neuronas dopaminérgicas del VTA es que al activarse se produce la liberación de DA en los terminales dopaminérgicos que proyectan a otros núcleos del circuito de la

5

recompensa y en la región somatodendrítica de las neuronas dopaminérgicas del VTA. El papel crítico del VTA y la liberación somatodendrítica de dopamina (DA) sobre las propiedades reforzantes de cocaína es avalado por la observación que la administración de un antagonista dopaminérgico intra-VTA reduce las propiedades reforzantes de cocaína en ratas (Ranaldi y Wise, 2001).

La cocaína es un psicoestimulante altamente adictivo, que tiene como blanco farmacológico directo el transportador de DA (DAT) (Kuhar y cols, 1990). La cocaína bloquea el DAT disminuyendo la recaptura de DA y de esta manera incrementa los niveles extracelulares de DA. Sin embargo, recientemente se demostró que los ratones nulos del DAT son capaces de auto-administrarse cocaína. Este hallazgo se debe a que la cocaína aumenta los niveles extracelulares de DA en el NAc de los ratones sin DAT debido a que este psicoestimulante posee una alta afinidad no sólo por el DAT sino que también por el transportador de NE (NET) (Sitte y Freissmuth, 2010) y por el transportador de 5-HT (SET) (Rothman y Baumann, 2003), por lo que la cocaína es capaz de bloquear también dichos transportadores (Pierce y Kumaresan, 2006). Las activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA, como se mencionó anteriormente, induce la liberación de DA desde terminales axónicos distales y de las regiones somatodendríticas de las neuronas dopaminérgicas en el mismo VTA. Por lo tanto, cocaína aumenta los niveles de DA en los núcleos inervados por las neuronas dopaminérgicas y en el mismo VTA. La evidencia indica que el aumento en los niveles extracelulares de DA inducido por cocaína, y compartido con todas las drogas de abuso, subvace a las propiedades adictivas de dichas drogas. Cocaína es una de las drogas más utilizadas en modelos animales del proceso adictivo debido a su alto potencial adictivo. Si bien cocaína tiene un mecanismo de acción molecular único y conocido, comparte los mismos efectos sobre el circuito de la recompensa con todas las drogas de abuso. El trabajo experimental con cocaína se facilita, además, por sus características farmacocinéticas que permiten su administración sistémica por vía intraperitoneal (i.p) o intravenosa. Esta droga es rápidamente absorbida por distintas vías de administración y también atraviesa la barrera hematoencefálica. Sus efectos al administrarse i.p aparecen a los 5 minutos. El tiempo de vida media plasmático es de aproximadamente 50 minutos. Además, es rápidamente metabolizada principalmente por hidrólisis enzimática, alrededor de un 45% de su metabolización es hepática y un 45% de metabolización por enzimas séricas. Los productos de dichas metabolizaciones son benzoilecgonina y ecgonina metil éster, respectivamente (Ambre y cols., 1988). Entre el 5 y el 10% de la dosis de cocaína se excreta por la orina sin sufrir cambios (Ambre y cols., 1988). Debido a estas características utilizaremos la administración i.p de cocaína como droga de abuso tipo en esta tesis.

#### 1.3. Antecedentes para la hipótesis

La administración repetida de cocaína directamente en el VTA es suficiente para inducir la expresión de sensibilización locomotora, cambio perdurable que se ha asociado al proceso adictivo (Cornish y Kalivas, 2001). Esta observación y otras sugieren que el aumento en los niveles extracelulares de DA inducidos por cocaína, así como por las otras drogas de abuso en el VTA, es responsable de los cambios plásticos que se generan en este núcleo por la administración repetida de cocaína y las otras drogas de abuso. Kalivas y Duffy (1995), describieron mediante experimentos de microdiálisis intra-VTA, acoplado a la detección de glutamato, que una dosis aguda i.p de cocaína induce un leve aumento en los niveles extracelulares de DA y de glutamato en el VTA de rata, y que este aumento en los niveles de glutamato se debe a la activación de receptores de DA tipo 1 (DA-D<sub>1</sub>), posiblemente localizados en terminales glutamatérgicos del VTA. En el año 1998, los mismos autores mostraron que la administración de una dosis de cocaína a ratas que fueron previamente expuestas por 7 días a la administración repetida de cocaína seguida por 21 días de abstinencia, induce un aumento en los niveles extracelulares de glutamato en el VTA comparado con ratas controles, efecto que es dependiente de la activación de los receptores DA-D<sub>1</sub>. Además, este aumento en la liberación de glutamato dependiente de la activación de receptores DA-D<sub>1</sub> se ha correlacionado con el aumento de la actividad locomotora que se observa en los animales pre-expuestos a cocaína, sensibilización psicomotora que sugiere cambios plásticos perdurables asociado a conducta tipo adictiva. Recientemente, el grupo de Caine (2007), mostró que los ratones nulos para el receptor DA-D<sub>1</sub> son incapaces de auto-administrarse cocaína, es decir, no adquieren la conducta tipo adictiva a cocaína. Estos datos sugieren que la activación de los receptores DA-D<sub>1</sub> no sólo estaría involucrada en los cambios en la transmisión glutamatérgica del VTA por la administración aguda y repetida de cocaína, sino también en el efecto reforzante de la droga. La evidencia actual indica que la activación de los receptores DA-D<sub>1</sub> en el NAc tiene un papel clave en la recaída inducida por una nueva exposición a la droga (Anderson y cols, 2003). Como se ha descrito, las evidencias sugieren que los receptores DA-D<sub>1</sub> del VTA juegan un papel tanto en los efectos reforzantes de las drogas de abuso como en el aumento de la eficiencia de la sinapsis excitatoria sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA y a una sensibilización en la liberación de glutamato en el VTA, tras un período de abstinencia a la droga. Este aumento en la transmisión glutamatérgica en VTA de ratas expuestas previamente a cocaína (Ungless y cols, 2003), y la sensibilización en la liberación de el VTA de ratas se observa también en respuesta a la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), frente a un estímulo estresante en ratas que han sido expuesta a cocaína con un periodo de abstinencia a la droga.

CRH es un neuropéptido de 41 aminoácidos que actúa a través de la activación de dos tipos de receptores, los cuales corresponden a receptores de 7 dominios transmembrana acoplados proteína G, de tipo estimulantes preferentemente Gs, pero que también pueden activar otras vías de señalización, estos receptores corresponden a los llamados de tipo 1 (CRH-R<sub>1</sub>) y tipo 2 (CRH-R<sub>2</sub>) (revisado en Mantsch y cols, 2013). Este neuropéptido juega un papel clave en la regulación tanto las respuestas hormonales frente a estímulos estresantes, desde neuronas provenientes del lecho de la estría terminal (BNST) hacia el hipotálamos lateral (Forray y Gysling, 2004), como respuestas en conductas motivadas por la proyecciones neuronales desde el BNST al VTA, en donde se han observado que al bloquear el BNST se atenúa el restablecimiento en la búsqueda de drogas, de ratas expuesta a cocaína con un periodo de abstinencia, apoyando así la idea de la

importancia de esta proyección neuronal en la recaída a drogas de abuso (McFarland y cols, 2004).

Wang y cols (2005) mostraron que la exposición repetida de cocaína induce una sensibilización de la liberación de glutamato en el VTA dependiente de la activación de receptores de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH). Esta sensibilización es responsable de la recaída a la búsqueda de la droga producto de un estímulo estresante. Además, la exposición a estímulos estresantes como footshock (golpe eléctrico en las patas) induce un aumento significativo en los niveles extracelulares de CRH en el VTA, tanto en ratas controles como en ratas con experiencia previa a cocaína. Sin embargo, el footshock induce un aumento significativo en la liberación de glutamato y DA sólo en ratas con experiencia previa a cocaína. Estos autores también mostraron que el incremento en los niveles de glutamato y DA en el VTA, inducido por el estímulo estresante, induce el restablecimiento de la búsqueda de cocaína y que este efecto es bloqueado por la administración de antagonistas no selectivos de CRH. En el mismo año, Liu y cols (2005) mostraron, a través de estudios electrofisiológicos, que la exposición repetida a cocaína induce un cambio en la transmisión glutamatérgica, en la cual se muestra un cambio de depresión a facilitación glutamatérgica en el Septum lateral (SL), siendo esta facilitación mediada por receptores CRH-R<sub>2</sub>. Wang y cols (2007), utilizando microdiálisis *in vivo* e infusión intra-VTA de agonistas y antagonistas de los receptores a CRH, mostraron que el aumento de los niveles extracelulares de glutamato y DA en el VTA, inducido por un estímulo estresante como footshock en ratas con experiencia previa a cocaína, es completamente bloqueado por la administración intra-VTA de un antagonista selectivo de los receptores CRH-R<sub>2</sub>; bloqueándose así el restablecimiento de la búsqueda de cocaína. Estos antecedentes son una fuerte evidencia del papel clave del VTA en la interacción entre el estrés y la recaída al consumo de drogas de abuso. Además, son consistentes con los estudios de inhibiciones transitorias de los núcleos que componen el circuito de la recompensa (McFarland y cols., 2004). En este estudio se mostró que la inhibición transitoria del VTA evita la recaída inducida por estrés. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos causantes de la sensibilización de la liberación de glutamato en el VTA, inducida por la administración repetida de drogas, que llevan a la recaída inducida por un estímulo estresante.

En la actualidad, no existe evidencia sobre el papel de la activación de los receptores DA-D<sub>1</sub> del VTA en la recaída al consumo por una nueva exposición a estímulos estresantes. Recientemente, Orozco-Cabal y cols (2008) reportaron que la administración repetida de cocaína induce una facilitación de la transmisión glutamatérgica desde la BLA a la CPFm. Mediante registros electrofisiológicos midieron la amplitud de corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC) de una sinapsis BLA-CPFm en cortes de cerebro de ratas tratadas repetidamente con cocaína. Ellos mostraron que la activación de los receptores DA-D<sub>1</sub> tiene un efecto inhibitorio de las EPSC en ratas controles y un efecto activador en las ratas tratadas repetidamente con cocaína. Además, mostraron que este efecto es aún mayor cuando se activan simultáneamente los receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub>. El análisis de pulsos pareados los llevó a sugerir que la localización de ambos receptores es presináptica, y que la co-activación de dichos receptores estaría regulando el aumento en la transmisión glutamatérgica en la CPFm, observado en las ratas tratadas repetidamente con cocaína. Interesantemente, el

aumento de las corrientes observado por la activación de ambos receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub> puede ser bloqueado tanto por un antagonista específico y selectivo del receptor DA-D<sub>1</sub>, como por un antagonista específico y selectivo del receptor CRH-R<sub>2</sub>. Estos datos farmacológicos sugieren que el aumento en la amplitud de las EPSC en la CPFm es producido por un sinergismo entre los receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub> sólo en las ratas tratadas repetidamente con cocaína. Dicho sinergismo puede ocurrir por uno o más mecanismos como: cooperatividad entres los receptores, vías de señalización en común y/o por la formación de heterómeros de los receptores.

Debido a las características estructurales de los receptores de 7 dominios transmembrana (GPCRs) y a su localización subcelular, estos interaccionan con una gran variedad de proteínas tanto intracelulares como de la misma membrana plasmática (revisado en Maggio y cols., 2005). Estas interacciones determinan las propiedades del receptor, como la compartimentación celular o la selección de señal, por citar algunas. Entre las proteínas que pueden interaccionar con GPCRs se incluyen miembros de la misma familia. Estos receptores clásicamente se han considerado como unidades funcionales independientes por lo que el descubrimiento de la oligomerización de GPCRs, es decir, la formación ya sea de homo o heterómeros de GPCRs, revolucionó la forma de afrontar el estudio de su funcionalidad (revisado en Maggio y cols., 2005). Hoy día, se acepta que la oligomerización es un hecho común en la biología de estos receptores. Los oligómeros presentan características funcionales diferentes a las de los receptores que los constituyen; confiriéndoles nuevas propiedades a los GPCRs, lo que constituye un posible mecanismo para generar nuevas funciones en estos receptores. Por tanto, la oligomerización ha dado lugar a un nuevo nivel de complejidad que gobierna la señalización y regulación de estas proteínas (revisado en Maggio y cols., 2005).

La interacción funcional y/o molecular de GPCRs o heterómeros de receptores metabotrópicos, ha aportado interesantes hallazgos sobre la regulación de la liberación de glutamato en núcleos del cerebro como el Cuerpo Estriado. Rodrígues y cols (2005), mostraron la co-existencia de los receptores de adenosina A2A y los receptores metabotrópicos de glutamato grupo 5 (mGluR<sub>5</sub>) en terminales glutamatérgicos del Cuerpo Estriado. Además, observaron a través de ensayos de liberación de glutamato en sinaptosomas, que al activar los receptores A<sub>2A</sub> y mGluR<sub>5</sub> ocurre una interacción funcional entre dichos receptores, aumentando la liberación de glutamato de manera sinérgica. Dicha interacción estaría modulando el proceso de neuroprotección inducido por adenosina en el Cuerpo Estriado. Además, Ciruela y cols (2006) mostraron que la transmisión glutamatérgica en el Cuerpo Estriado es modulada por la interacción entre receptores metabotrópicos de adenosina. Mediante las técnicas de inmunohistoquímica y co-inmunoprecipitación desde sinaptosomas provenientes del Cuerpo Estriado de ratas, mostraron que existen heterómeros de los receptores de adenosina A1-A2A y que dichos heterómeros están localizados preferentemente en los mismos terminales glutamatérgicos. Con experimentos de liberación de glutamato en sinaptosomas mostraron que dichos heterómeros modulan la transmisión glutamatérgica estriatal inducida por adenosina. Basado en estos antecedentes es razonable pensar que en el VTA operan mecanismos similares a los descritos en la CPF. Cabe preguntarse: Si la interacción entre receptores  $DA-D_1$  y  $CRH-R_2$ , localizados terminales en

glutamatérgicos en el VTA, determinan la sensibilización de la liberación de glutamato en ratas tratadas repetidamente con cocaína.

#### 1.4 Hipótesis y objetivos

#### 1.4.1 Hipótesis

La sensibilización de la liberación de glutamato en el VTA inducida por la exposición repetida a cocaína, se debe a la interacción entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> presentes en los terminales glutamatérgicos.

#### 1.4.2 Objetivo general

Estudiar el papel de los receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub> en la sensibilización de la liberación de glutamato en el VTA inducida por la administración repetida de cocaína.

#### 1.4.2 Objetivos específicos

#### 1.4.2.1 Objetivo 1

Determinar si la sensibilización de la liberación de glutamato en el VTA inducida por la administración repetida de cocaína, se debe a la interacción entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>.

#### 1.4.2.2 Objetivo 2

Determinar si los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> co-existen en aferencias glutamatérgicas que inervan el VTA de rata.

#### 1.4.2.3 Objetivo 3

Determinar la interacción molecular entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> *in vivo* y en estudios de expresión heteróloga.

#### 2. MATERIALES Y METODOS

#### 2.1. Animales

Se utilizaron ratas machos *Sprague-Dawley* de peso entre 250-260 g, del vivero de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las ratas se mantuvieron en una habitación climatizada a 22 ± 1°C con un ritmo de luz y oscuridad de 12 horas. Las ratas dispusieron de alimento y agua *"ad libitum"* hasta el momento del experimento. Las ratas se manipularon de acuerdo a las normas establecidas para el cuidado de animales de la Sociedad de Neurociencias, USA y de la Facultad de Ciencias Biológicas, PUC. Los grupos de ratas que se utilizaron para el estudio fueron los siguientes: **Grupo 1:** Ratas controles (tratadas con salino). **Grupo 2:** Ratas tratadas repetidamente con cocaína, con un período de abstinencia de 1 día. Para evaluar el estado adictivo de las ratas, que se utilizaron en estudios neuroquímicos y moleculares de este proyecto de tesis, se utilizó el paradigma experimental de *preferencia de lugar condicionada (CPP)* (Tzschentke, 2007).

#### 2.2. Preferencia de lugar condicionada

Para realizar el paradigma experimental de CPP utilizamos una cámara con dos compartimentos distintos separados por un compartimento neutral. Las ratas se pusieron en el compartimento neutral y luego se les permitió la libre exploración por 15 minutos, se registró el tiempo que permanecieron en cada compartimento. Una vez identificada la preferencia natural de cada animal, realizamos el período de condicionamiento que consiste en la administración de solución salina (ratas controles) o de 15 mg / kg, i.p de cocaína (ratas tratadas repetidamente), dos veces

por día durante 7 días a las 9:00 AM y 4:00 PM. Una vez inyectadas, las ratas controles y las ratas tratadas con cocaína se colocaron por 30 minutos en el compartimento menos preferido. Al día siguiente de la última inyección del período de condicionamiento, se realizó la prueba de CPP; en esta se les ofreció a las ratas la oportunidad de elegir entre los dos compartimentos. El tiempo que el animal pasa en el compartimento asociado a la cocaína es un índice del valor reforzante de la droga. El animal expresará preferencia por aquel contexto donde ha experimentado un refuerzo positivo. Las ratas que presenten preferencia por el compartimento pareado a cocaína, serán divididas en 2 subgrupos. Un subgrupo se utilizó para experimentos neuroquímicos al día siguiente de la prueba de CPP.

#### 2.3. Microdiálisis in vivo

Esta técnica se utilizó para estudiar el efecto de la administración repetida de cocaína y como la activación de los receptores mencionados anteriormente afecta los niveles extracelulares de glutamato, GABA y DA en el VTA. Las ratas se anestesiaron con hidrato cloral (400 mg/kg, i.p) para implantar unilateralmente una sonda de microdiálisis (CMA12/microdiálisis) en el VTA. Las coordenadas para la instalación de la sonda en VTA fueron: 5,2 mm posterior a bregma, 2,2 mm laterales en un ángulo de 12° y 8,3 mm dorsoventral. A través de la sonda se dializó solución artificial de liquido cefalorraquídeo (CSF) a una velocidad de 2 µl/min recolectando muestras cada 10 minutos. Las muestras se recibieron en PCA 0,2 N y se determinaron los niveles extracelulares de los neurotransmisores anteriormente

mencionados. Durante la microdiálisis se perfundieron intra-VTA agonistas y antagonistas específicos y selectivos de los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> para determinar si la activación de estos receptores en los distintos grupos de animales afecta la liberación de glutamato y DA en el VTA (ver Tabla 1). Una vez finalizado el experimento, las ratas se decapitaron para confirmar la correcta entrada de la sonda, los cerebros se removieron y se mantuvieron en paraformaldehído (PFA) 4% por 24 horas, y a continuación se realizaron cortes coronales de 50µm de espesor en vibrátomo (*Sectioning System series* 3000); y luego se tiñeron con Cresyl Violeta para determinar por análisis histológico la instalación de la sonda (Figura 2).

#### 2.4. Análisis de las muestras de microdiálisis

**2.4.1. DA:** se analizó utilizando HPLC acoplado a detección amperométrica siguiendo los protocolos estándares del laboratorio (Sotomayor y cols, 2005).

**2.4.2. Glutamato y GABA**: se determinaron de acuerdo al método de Lindroth & Mopper (1979), con derivatización y HPLC acoplado a un detector fluorométrico y siguiendo el protocolo en uso en el laboratorio (Forray y cols, 1999).

Compuesto	Descripción	Peso molecular	K <sub>i</sub> (nM)
SKF-38393	Agonista selectivo de los receptores	336,23 g/mol	1,0
	tipo DA-D₁ (TOCRIS)		
SKF-83822	Agonista selectivo de los receptores	424,76 g/mol	3,2
	tipo DA-D <sub>1</sub> (TOCRIS)		
SCH-23390	Antagonista de los receptores tipo	342,24 g/mol	0,2
	DA-D <sub>1</sub> (TOCRIS)		
CRH	Agonista selectivo de los receptores	4757,45 g/mol	-
	tipo CRH (Sigma Aldrich)		
K-41498	Antagonista de los receptores a	3632,26 g/mol	0,66
	CRH-R <sub>2</sub> (TOCRIS)		
CP-154526	Antagonista de los receptores a	362,94 g/mol	12
	CRH-R₁ (TOCRIS)		

Tabla 1. Agonistas y antagonistas para los receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub>



В





**Figura 2. Muestra la localización de la sonda de microdiálisis en el VTA de rata. A)** se muestra el esquema del Atlas de Paxinos y Watson (1986) con la localización de la cánula CMA 12 en azul. **B)** se muestra un ejemplo de localización de sonda en el VTA, luego de tinción con cresyl violeta. En todos los experimentos realizados en esta tesis se utilizaron las coordenadas 5,2 mm posterior a bregma, 2,2 mm laterales en un ángulo de 12° y 8,3 mm dorsoventral.

#### 2.5. Preparación de sinaptosomas de cerebro de rata

Para montar esta preparación se utilizaron ratas naive, las cuales se sacrificaron mediante decapitación, sus cerebros se extrajeron y se pusieron inmediatamente en solución fisiológica a 4°C. Tras aislar cuidadosamente el cerebro completo se microdisectaron el VTA y otras áreas como el cuerpo estriado, NAc, SL y CPF, para utilizar como control. Para la obtención de sinaptosomas se utilizó centrifugación diferencial y un gradiente discontinuo de *Percoll*, según lo descrito por Nagy y Delgado-Escueta (1984), con modificaciones de Araya y cols (2007) y de Rodrígues y cols (2005). Este protocolo permite obtener sinaptosomas con baja cantidad de densidades postsinápticas (Rodrígues y cols, 2005). Tras aislar cuidadosamente el núcleo (bilateralmente) se homogenizó en 0,5 ml de solución 1 (HEPES 10mM; Sacarosa 320 mM; EDTA 3 mM; pH 7,4), en 3 intervalos de 5 segundos cada uno a 4°C. Luego se centrifugó a 1000g durante 10 minutos a 4°C (dos veces, cuando se obtiene una cantidad de tejido muy grande como por ejemplo de áreas como Estriado, hipocampo, PFC, etc). Luego el sobrenadante se centrifugó a 17000g durante 20 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 70 µl de solución 5 (HEPES 10mM; Sacarosa 320 mM; pH 7,4) hasta completa homogenización. El gradiente de Percoll (ver Tabla 2) se obtuvo depositando en un tubo eppendorf de 1,5 ml, levemente inclinado en hielo, 300 µl de solución de *Percoll* al 23 %; seguido de 300 µl de Percoll al 10 % el cual se añadió lenta y cuidadosamente para evitar romper las fases entre una solución y otra. Finalmente, sobre estas dos fases formadas se añadió en iguales condiciones, una mezcla de 230 µl de Percoll al 3 % más el pellet disuelto en los 70 µl de solución 5. El volumen de esta mezcla final fue de 300 µl, la cual varió la proporción de *Percoll* en aproximadamente un 2,3 %. Conservando el ángulo de inclinación, se centrifugó a 15000g durante 20 minutos a 4°C. La utilización de un gradiente discontinuo de Percoll permite separar exitosamente varios tipos de células y estructuras subcelulares, brindando una mejor isoosmolaridad que carece de toxicidad para las células. Luego de la centrifugación v conservando el ángulo de inclinación se retiró cuidadosamente el tubo de la centrifuga para recuperar los sinaptosomas, visibles como una banda de color crema localizada en la interfase 10% - 23%. Para ello, se eliminó la fase acuosa superior a la banda, seguido de dos lavados de la fracción sinaptosomal obtenida con solución 6 (Sacarosa 320mM) en igual volumen a la fracción y luego la mezcla fue sometida a un proceso de centrifugación de 24000g durante 20 minutos a 4°C (2 veces). Finalmente los sinaptosomas (pellet obtenido de los lavados anteriores) se resuspendieron en solución 6, para evitar que revienten, estos podrán almacenarse a -20°C y ser utilizados para realizar Inmunoflorescencia. Los sinaptosomas sin resuspender (sólo el pellet), se utilizaron para estudios de morfología (ultraestructura) e inmunogold (Microscopía electrónica). Para los experimentos de co-inmunoprecipitacion y western blot los sinaptosomas se resuspendieron en tampón de lisis (RIPA: 25 mM Tris•HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, Thermo Scientific Rockford.IL) con inhibidor de proteasas. Una vez resuspendidos se cuantificó la concentración de proteínas.

## Tabla 2: Preparación de soluciones para el gradiente de Percoll

Solución 2: Corresponde a sacarosa 2,5 M.

**Solución 3:** Debe ser preparada *in situ*, corresponde a 50µl de solución 2 + 450µl de

solución de *Percoll* (coloide de PVP-sílicagel, Sigma Aldrich).

Solución 4: HEPES 10 mM; Sacarosa 250 mM; EDTA 3 mM; pH 7,4

Solución al 3%: Debe ser preparada *in situ* , corresponde a 38  $\mu$ l de solución 3 + 762

μl de solución 4

Solución al 10%: Debe ser preparada in situ , corresponde a 124  $\mu$ l de solución 3 +

876  $\mu$ l de solución 4

Solución al 23%: Debe ser preparada in situ , corresponde a 284  $\mu$ l de solución 3 +

716  $\mu$ l de solución 4

#### 2.6. Cuantificación de proteínas

Para esto, se utilizó el kit comercial *Micro-BCA (Acido Bicinconínico,* Thermo Scientific Rockford.IL). El *BCA* es un compuesto que forma un complejo púrpura intenso con iones cuprosos (Cu<sup>1+</sup>) en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico que detecta el ión Cu<sup>1+</sup> producido en una reacción entre las proteínas y el Cu<sup>2+</sup> en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos. Luego, se realizaron experimentos para controlar la calidad de la preparación de sinaptosomas provenientes de Cuerpo Estriado, de CPF, de SL y del VTA de ratas controles utilizando las técnicas de *Western Blot,* co-inmunoprecipitacion e Inmunofluorescencia.

#### 2.7. Inmunofluorescencia en sinaptosomas del VTA de rata

De acuerdo al protocolo descrito por Ciruela y cols (2006), los sinaptosomas del VTA se adhirieron a cubre objetos por 24 horas a 37°C con poli-D-Lisina (0,1mg/ml). Al día siguiente se fijaron con PFA 4%/Sacarosa 10% en PBS 1x por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron 3 veces con solución A (Glicina 20mM en PBS). Se permeabilizaron con solución de Triton x-100 0,2% en solución A por 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación muy suave. Posteriormente, se bloquearon a temperatura ambiente utilizando solución B (Albúmina al 4% en PBS) por 1 hora a temperatura ambiente, para finalmente realizar la inmunofluorescencia. Los anticuerpos primarios se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente, se
utilizaron anticuerpos primarios contra los transportadores vesiculares de glutamato anti-vGluT1 y anti-vGluT2 (*Neuromab y Chemicon*, 1:500 en ambos casos). Estos transportadores vesiculares de glutamato vGluT1 y vGluT2 no co-existen en los mismos terminales sinápticos (Herzog y cols, 2001), por lo tanto la utilización de estos anticuerpos nos permitió distinguir entre terminales provenientes de corteza (vGluT1) o de áreas subcorticales (vGluT2). Para controlar la calidad de la preparación de sinaptosomas se realizaron inmunofluorescencias utilizando un anticuerpo primario anti-Sinapsina I (*Cell Signaling*, 1:1000) y anti-SNAP25 (*Neuromab*, 1:200) como marcadores específicos de terminales sinápticos. Para controlar la baja cantidad de densidades postsinápticas se utilizó un anticuerpo primario anti-PSD95 (*NeuroMab*, 1:300).

Para determinar la presencia de los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en los sinaptosomas, primero se realizó inmunofluorescencia utilizando los siguientes anticuerpos primarios anti-CRH-R<sub>2</sub> (N-20 o C-15, *Santa Cruz; Sigma Aldrich y Abcam,* 1:500 en todos los casos) y los anticuerpos primarios anti-DA-D<sub>1</sub> (H-89 o G-22, *Santa Cruz y Sigma Aldrich,* 1:500 en todos los casos). Luego, se realizaron experimentos de doble inmunofluorescencia para los transportadores vGluT1 y vGluT2 con cada receptor, con el fin de determinar la localización de dichos receptores en terminales glutamatérgicos del VTA de rata. Posteriormente, para determinar la co-existencia de los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>, se realizó doble inmunofluorescencia en sinaptosomas del VTA. Finalmente, para determinar la localización de los receptores realizamos triple inmunofluorescencia para vGluT2/CRH-R<sub>2</sub>/DA-D<sub>1</sub> y para vGluT1/CRH-R<sub>2</sub>/DA-D<sub>1</sub> en sinaptosomas del VTA.

25

Luego de la incubación con anticuerpo primario, los sinaptosomas se lavaron 3 veces con solución B y se incubaron con anticuerpos secundarios de la misma forma que los primarios, pero estos adicionalmente deben ser protegidos de la luz. Los anticuerpos secundarios que se utilizaron corresponden a: *anti-lgG-mouse* AlexaFluor 488; *anti-lgG-goat AlexaFluor* 546; *anti-lgG-mouse AlexaFluor* 594; *anti-lgG-rabbit AlexaFluor* 637; *anti-lgG-guinea pig* FITC; *anti-lgG-rabbit* Cys3, según correspondan y todos se utilizaron en una concentración de 1:200. Posteriormente, se lavaron con solución A protegido de la luz. Se secaron los cubres a temperatura ambiente, protegidos de la luz, y se montaron con medio Dakocytomation (Dako). Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal Olympus Fluoview 1000 del Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. La cuantificación de la inmunoreactividad y colocalización de los sinaptosomas se analizó con el programa Image J plugin Macros Count-Colocalize (Ciruela y cols, 2006).

#### 2.8. Ultra estructura e *inmunogold* en sinaptosomas del VTA de rata

#### 2.8.1. Ultra estructura del VTA y de sinaptosomas del VTA de rata

Para la realización de esta técnica, ratas controles y ratas tratadas con cocaína, según sea el caso, se anestesiaron con una dosis de 400 mg/kg de Hidrato de Cloral 16% y se perfundieron intracardialmente a un flujo promedio de 25 ml/min, utilizando una bomba peristáltica. Se perfundió con 80 ml de suero salino a temperatura ambiente seguido de 500 ml de solución de fijación (PFA 4% /Glutaraldehído 2,5% en tampón fosfato 1M, pH 7,4), fresca y fría. Luego, se

removieron los cerebros y se extrajo el VTA bilateralmente, luego se fijó por inmersión durante 2 horas con la misma solución de fijación. Los sinaptosomas se fijaron con la misma solución de fijación usada en ratas. Luego tanto los sinaptosomas como los trozo de VTA, se lavaron con tampón fosfato 0,1M y se postfijo con tetróxido de osmio al 1%, durante 90 minutos. Después de un lavado se tiñó en bloque con acetato de uranilo al % durante 1 hora y luego se deshidrató en una batería de acetona en concentraciones crecientes de 50 a 100% durante 20 minutos cada una. Se preincluyó en EPON/acetona (1:1) durante toda la noche, EPON puro durante 6 horas y se polimerizó en estufa a 60°C durante 24 horas.

#### 2.8.2. Inmunogold de sinaptosomas de VTA de rata

Para realizar estos experimentos, los sinaptosomas se fijaron en PFA 4%/Glutaraldehído 0,3% a 4°C. Una vez fijados se lavaron tampón fosfato 0,1M durante toda la noche a 4°C Luego se deshidrató en una batería de etanoles de 50 a 100% durante 10 minutos cada una a 4°C. Se preincluyó en *LR-White*/etanol (1:1) durante 4 horas y en *LR-White* puro durante toda la noche. La polimerización se realizó a 50°C durante 24 horas. Se utilizó ultramicrótomo (*Sorvall MT-2B*) para la obtención de cortes finos, estos se recogieron en grillas de níquel de 200-300 *mesh.* En las grillas se incubaron en BSA 5% (en PBS 1x) durante 30 minutos, luego se lavaron las grillas con solución de BSA 0,1%/Triton x-100 0,05%, para permeabilizar. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo primario anti-CRHR<sub>2</sub> o anti-D<sub>1</sub> (*Sigma aldrich*, 1:10 en ambos los casos) durante

1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavaron las grillas con la solución de permeabilización (3 veces) y se incubaron 90 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Proteína A 20nm, *Sigma aldrich*, 1:100). Posteriormente, se enjuagaron las grillas con PBS (1x) y se dejaron secar para finalmente contrastar con acetato de uranilo al 1% acuoso durante 15 minutos. Como control se realizó una incubación sin anticuerpo primario. Todos los experimentos se realizaron tanto en sinaptosomas del VTA de ratas controles como en sinaptosomas de ratas tratadas con cocaína. La observación de las muestras tanto para Inmunogold como para ultraestructura se realizó en un Microscopio de transmisión (*Philips, modelo Tecnai 12 biotween A80kV*).

#### 2.9. Western Blot en sinaptosomas de VTA de rata

Para la detección de proteínas se utilizó geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se incubaron con anticuerpos primarios específicos para cada proteína en estudio (mencionados anteriormente) y luego se incubó con anticuerpos secundarios para finalmente realizar el revelado mediante quimioluminiscencia (*Super signal west pico chemiluminescent substrate, Thermo Scientific Rockford.IL*). Se evaluó la calidad de la preparación de sinaptosomas analizando las proteínas marcadoras de elementos postsinápticos anti-PSD95 (*Neuromab* 1:10000) y presinápticos anti-Sinapsina I (*Santa Cruz* 1:10000), anti-Snap25; anti-vGluT1 y anti-vGluT2 (*Neuromab*, 1:500 estos últimos). Una vez optimizadas las condiciones de trabajo, se prepararon sinaptosomas del VTA de ratas controles y ratas tratadas con cocaína, se evaluó la

presencia de los receptores CRH- $R_2$  y DA-  $D_1$  (utilizando todos los anticuerpos mencionados anteriormente contra estos receptores, 1:200 en todos los casos).

#### 2.10. *Crosslink* de sinaptosomas del VTA de rata

Para evaluar la presencia de los receptores en la membrana se utilizó un kit de aislamiento de proteínas de membrana (*Cell surface protein isolation*, Thermo Scientific Rockford. IL). Para estos experimentos, a 100 µg de sinaptosomas del VTA de rata se les adicionó 100 µl de la solución *EZ-LinkSulfo-NHS-SS-Biotin* (1mg/ml) y se incubó por 30 minutos, luego se agregó de 100 µl de *quenching solution* y se lavó con PBS/glicina (0,75 mM, 2 veces a 500 g). El *pellet* obtenido se resuspendió en RIPA con tuberculina y luego se centrifugó a 22000 g por 30 minutos. Por otra parte, las columnas fueron activadas según lo descrito en el kit (*NeutrAvidin Agarose column*). El sobrenadante se pasó por las columnas y se lavó con la solución del kit. Finalmente, se eluyó de las columnas con 50 µl de tampón de carga, para posteriormente continuar con el protocolo de *Western blot* 

Antes de cargar las muestra en el gel de poliacrilamida, se les adicionó 2,5 µl de DTT y se calentó por 30 minutos a 25°C. Como controles se cargó en el gel 50µg de sinaptosomas resuspendidos en tampón RIPA más tampón de carga, además se cargó lo obtenido en el lavado antes de la elución. Todos los experimentos se realizaron tanto con ratas controles como con ratas tratadas con cocaína.

#### 2.11. Co-inmunoprecipitación en sinaptosomas del VTA de rata

Los sinaptosomas obtenidos del VTA, tanto de ratas controles como de ratas tratadas con cocaína, se resuspendieron en tampón de lisis (RIPA: Thermo Scientific Rockford.IL) para obtener una concentración final de proteínas de 1mg/ml, el cual contiene además inhibidor de proteasas. Se separó el 10% del volumen de la solución de sinaptosomas del VTA lo que corresponderá al "input". El resto de la solución de sinaptosomas del VTA se inmunoprecipitó con 4 µg del anticuerpo anti-DA-D<sub>1</sub> o anti-CRH-R<sub>2</sub>. Como control se inmunoprecipitaron sinaptosomas del VTA con 4 µg del anticuerpo anti-Sinapsina I como una IgG irrelevante. Además se realizaron los mismos experimentos pero en sinaptosomas de estriado como control de la no expresión de receptores CRH-R<sub>2</sub>. Los inmunoprecipitados se dejaron O/N a 4°C en rotación y a la mañana siguiente se les adicionó el kit TrueBlot (Bioscience) y se incubaron por 2 horas a 4°C en rotación. Mediante la utilización de este kit, se evita la detección de la cadena pesada (55kDa) y la cadena ligera (23kDa) de las IgG, y por tanto elimina la interferencia con la detección del anticuerpo de interés, en nuestro caso CRH-R<sub>2</sub>, cuyo peso molecular (55kDa) coincide con las cadena pesada de las IgG. Posteriormente, los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces con el tampón de lisis y se resuspendieron en tampón de carga (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 20% glicerol y azul de bromofenol) con 50 mM de ditiotreitol (DTT) recién preparado. Los inputs (10% del extracto total) se resuspendieron en tampón de carga. Luego todas las muestras se calentaron por 20 minutos a 25°C antes de cargarse en el gel de poliacrilamida. Luego se continuó con el protocolo de Western Blot.

#### 2.12. Cultivos celulares

Para todos los estudios se utilizaron células HEK293T (CRL-1573): derivadas de riñón de embrión humano (ATCC) (Manassas, VA, USA). Los pasajes de cultivo que se utilizaron para esta tesis fueron entre 5 y 10.

Como medio de crecimiento para células HEK293T se utilizó Suero Bovino Fetal, FBS (GIBC0); Penicilina/Estreptomicina 100X [10000 U/ml] (GIBCO); GlutaMax 100X (GIBCO); Aminoácidos no esenciales 100X (GIBCO) y Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM base). Se reconstituyó el DMEM base en polvo en 950 ml de H<sub>2</sub>O desionizada estéril, se agregaron 3,7 g de NaHCO<sub>3</sub>, y se ajustó el pH a 7,2. Una vez completado el volumen a 1 L se esterilizó la mezcla por filtración en filtros de 0,2 µm (DMEM, GIBCO). También se utilizó Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS). Para ello, se reconstituyó el PBS en polvo en 800 ml de H2O desionizada estéril y se ajustó el pH a 7,2. Una vez completado el volumen a 1 L se esterilizó la mezcla por filtración en filtros de 0,2 µm. (PBS, GIBCO). También se utilizaron bacterias, células competentes *E.coli* DH5  $\alpha$ : F- $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYAargF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1  $\lambda$ (Invitrogen) (California, USA). Medio LB líquido, Bacto Triptona (Becton Dickinson) 10 g/L; Extracto de levadura (GIBCO) 5 g/L; NaCl (Winkler) 10 g/L y se disolvieron en agua destilada, y se ajustó a pH 7,0 con NaOH y luego se esterilizó en autoclave. Medio LB sólido, Se disolvió 1,5 g/100ml de Select-Agar (GIBCO) en LB líquido y se esterilizó en autoclave.

Además se utilizaron los siguientes: plásmidos, Vector pECFP-N1 (Clontech): Posee el cDNA de CRH-R<sub>2</sub>; Vector pEYFP-N1 (Clontech): Posee el cDNA de DA-D<sub>1</sub>;

Vector pRluc-N1 (Clontech): Posee el cDNA de DA-D<sub>1</sub>; Vector pRluc-N1 (Clontech) (donado por Dr. Ciruela): Posee el cDNA de CRH-  $R_{2\alpha}$  y Vector pEYFP-N1 (Clontech): Posee el cDNA de GABA<sub>2b</sub>, todas las construcciones provienen de humano y la proteína de fusión está localizada en el extremo C-terminal.

Los reactivos e insumos de biología molecular utilizados se obtuvieron de los siguientes proveedores: PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent Technologies), AxyPrep<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit 250-prep (Axygen Biosciences), Enzimas de restricción, tampones de reacción de enzimas de restricción, BSA (New England Biolabs), Taq DNA polimerasa, SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen), dNTP mix 10mM, GeneRuler<sup>™</sup> 100 bp Plus DNA Ladder, GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder, Buffer de carga 6X (MBI Fermentas, Inc.), Etanol, isopropanol (Merck), QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), Rapid DNA Ligation Kit. (Roche Diagnostics), Agarosa, solución TAE 50X, cloroformo (Winckler), Ampicilina y Kanamicina (USBiological), Agua ultra pura (IDT), Equipos y otros: Termociclador PTC-200 (MJ Research). Cámara de electroforesis horizontal (Invitrogen). Trans-iluminador UV Vilmert Lourmat. Equipo fotográfico KODAK: Cámara DC290 y software KODAK 1D Limited Edition v.3.5.4.

#### 2.13. Clonamientos de receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub>

En el laboratorio del Dr. Francisco Ciruela (Universidad de Barcelona, España), se clonó el receptor CRH- $R_{2a}$  en el vector pcDNA3.1, a partir del templado de CRH- $R_{2a}$  humano (Genoma cube), utilizando partidores específicos (ver Tabla 3). Además el

Dr. Ciruela donó el receptor DA-D<sub>1</sub> *wild type* y el DA-D<sub>1</sub>-YFP, a los cuales se les adicionó una secuencia *Kozak*.

Para amplificar el ADN de las construcciones señaladas en la tabla 3, se utilizó la técnica de PCR, la enzima "*PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase*" (Agilent Technologies), junto a los partidores y vectores, siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las construcciones contienen la secuencia de Rluc o la proteína fluorescente correspondiente en el extremo C-terminal.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador G-STORM (GS482). Los productos de PCR se mantuvieron a 4°C hasta ser analizados mediante geles de agarosa.

#### 2.14. Transfección de células HEH293T

#### 2.14.1. Fluorescencia e Inmunofluorescencia en células HEK293T

Para evaluar la distribución de los receptores en la sobre expresión de estos fusionados a proteínas, se realizó inmunofluorescencia y fluorescencia de las construcciones que se utilizaron posteriormente para los experimentos de FRET y BRET en células HEK293T, las cuales se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Se utilizaron células con 80–90% de confluencia. Para estos experimentos, primero se trataron cubreobjetos de 12 mm con poli-D-lisina 50 µg/ml en una placa de 24 pocillos (*Falcon*) por toda la noche a 37°C. Luego se lavó cada cubreobjeto con PBS 1X estéril y sobre ellos se sembraron las células (70.000 células HEK293T por pocillo) en medio de crecimiento. Luego de 24 horas, las células fueron transfectadas con 400 ng de DNA plasmidial del vector

de expresión respectivo. Para ello, se siguió el protocolo sugerido por el fabricante de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) usando la relación 1:3 (DNA: Lipofectamina), a) 20μL (DNA+H2O ultra pura) + 30 μL OPTIMEM. b) 1,2μL Lipofectamina + 48,8μL OPTIMEM, reposo 5 minutos. c) Mezcla de ambas soluciones (a+b) y reposo por 20 minutos. Finalizado el tiempo, la mezcla DNA-liposoma se goteó directamente a cada pocillo sobre el medio de cultivo con las células sembrada. Luego de 6 horas se reemplazó el medio de transfección por medio de cultivo fresco.

Para evaluar la distribución de las proteínas fluorescentes a las 48 horas posttransfección se fijaron las células con PFA 4% frío (en PBS; pH=7,4) por 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 2 veces con solución A. Se dejaron secando los cubreobjetos (con las células) por 1 hora a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Pasado el tiempo, los cubreobjetos se montaron con DAKO en los portaobjetos. Se dejó secando por 1 día en plano horizontal. Para los receptores fusionados Rluc. se el caso de а realizó inmunofluorescencia, en donde una vez fijados se procedió con el mismo protocolo descrito para la inmunofluorescencia en sinaptosomas y se utilizaron los mismos anticuerpos mencionados. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal Olympus Fluoview 1000 del Servicio de Microscopía de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los láseres utilizados fueron los siguiente:(a) YFP (Ex\*517 Em\*528); (b) CFP (Ex\*436 Em\*488) para la fluorescencia. Para

inmunofluorescencia los láseres de excitación para los anticuerpos secundarios usados (AlexaFluor 488 y AlexaFluor 594).

#### 2.14.2 Transferencia de energía por resonancia

Esta técnica se basa en la transferencia de energía de excitación entre dos dipolos electromagnéticos, un dador energético y un aceptor. Para que este fenómeno tenga lugar es necesario que se cumplan dos requisitos. Primero, que el espectro de emisión del dador y el espectro de excitación del aceptor se solapen, de forma que el dador no emita completamente la energía que debiera, si no que transfiera parte de su energía al aceptor, el cual emite como si hubiera sido excitado directamente. Segundo, para que la transferencia tenga lugar tanto el dador como el aceptor deben estar muy cercanos en el espacio (<100 Å). Esta distancia es equivalente a las dimensiones de los complejos moleculares biológicos. Así, esta técnica ofrece una aproximación única que permite detectar la dimerización de proteínas en células vivas, sin perturbar el entorno donde este fenómeno ocurre.

Para determinar la interacción entre los receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub>, se realizó la técnica de transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET; *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*). Finalmente para evaluar en células individuales y además calcular la eficiencia de dicha interacción se utilizó la técnica de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET; *Fluorescence or Förster Resonance Energy Transfer*) acoplada a la técnica de

recuperación después de fluorescencia *photobleaching* (FRAP: *Fluorescence recovery after photobleaching*) (FRET/FRAP).

#### 2.14.1.1. BRET

Para los experimentos BRET se co-transfectaron células con 1 µg de DNA de la construcción CRH-R<sub>2</sub>-Rluc o DA-D<sub>1</sub>-Rluc, o CRH-R<sub>2</sub>-Rluc más cantidades crecientes de DNA de las construcciones CRH-R<sub>2</sub>-YFP, o DA-D<sub>1</sub>-YFP, respectivamente. Como control se co-transfectaron células con 1 µg de DNA de la construcción CRH-R<sub>2</sub>-Rluc o DA-D<sub>1</sub>-Rluc, o CRH-R<sub>2</sub>-Rluc más GABA<sub>2b</sub>-YFP.48 horas postransfeccion las células se lavaron rápidamente (2 veces) en tampón HBSS/glucosa 10mM (HBSS es Hank's Buffered Salt Solution: 0,137 M NaCl; 5,4 mM KCl; 0,25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,0 mM MgSO<sub>4</sub>; 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub> a pH 7,4) y se resuspendieron en el tampón HBSS/glucosa 10mM/EDTA 1 mM. Para controlar el número de células, se determinó la concentración de proteínas utilizando el kit de Micro-BCA (Thermo Scientific Rockford. IL), para utilizar una concentración 20 mg de proteína de células en todos los experimentos, cabe señalar que todos los experimentos se realizaron en duplicado. Para cuantificar la fluorescencia de las construcciones (DA-D<sub>1</sub>-YFP, CRH-R<sub>2</sub>-YFP y GABA<sub>2b</sub>-YFP), las células se distribuyeron en microplacas de 96 pocillos (placas negras con fondo transparente) y se leyeron en el equipo FLOUstar (BMG LABTECH). Para la medición de BRET, el equivalente a 20 mg de suspensión de células se distribuyó por triplicado en microplacas de 96 pocillos (placas blancas con fondo blanco) y se les añadió 10μl de la enzima *coelenterazine H* 5mM. Se midió la bioluminiscencia FLOUstar después de 1 minuto de añadir la enzima, se obtuvieron los datos que permitieron la integración de las señales detectadas en el filtro a 485 nm (440-500 nm) y los 530nm (510-590 nm). Para cuantificar la luminiscencia de Rluc, las lecturas se tomaron después de 10 minutos de la adición la enzima, la señal BRET se determinó mediante el cálculo de la proporción de la luz emitida por YFP (510-590 nm) sobre la luz emitida por el Rluc (440 - 500 nm). Los valores netos BRET se obtuvieron de las diferencias entre la señal de fondo BRET detecta cuando Rluc se expresa por sí sola. Las curvas se ajustaron utilizando una regresión no lineal y de una fase ecuación exponencial (hipérbola) Y=Bmax \* X/(Kd + X)).

#### 2.14.1.2. FRET/FRAP

Las células HEK293T se crecieron en cubre objetos de 12 mm con poli-D-lisina y se transfectaron con 2µg las construcciones D<sub>1</sub>-YFP y CRH-R<sub>2</sub>-CFP. Estas corresponden a la pareja de fluoróforos más ampliamente utilizada para los experimentos de FRET/FRAP, la proteína fluorescente *Cyan* (CFP: Cyan Fluorescence Protein) que se excita a 400nm y emite a 510nm; y la proteína fluorescente amarilla (YFP: Yellow Fluorescence Protein) que se excita a 490nm y emite a 530nm. 48 horas después de la transfección se seleccionaron en forma individual las células que expresan ambas construcciones utilizando un microscopio de fluorescencia confocal Olympus Fluoview 1000. Una vez identificada las células a medir se establecieron los tiempos de iluminación en

25 milisegundos (ms) con una frecuencia de 40 Hz. Cada célula se excitó con la luz de 433 nm procedente de un policromador IV (TILL Fotónica). Las mediciones se grabaron en tiempo real y durante todo el experimento las células se perfundieron en forma continua con tampón HBSS. Las señales detectadas de FRET se digitalizaron con un conversor AD (Digidata1322A, Axon Instruments, Union City, CA) y se almacenaron en un computador mediante el uso del software de Clampex 9.0 (Axon Instruments). Después de esta grabación, las mismas células fueron expuestas a *photobleaching* del fluoróforo YFP. Esto se logró excitando en forma continua a 510 nm, durante 10 min. Finalmente, se realizó una grabación *post-photobleching* como se describió anteriormente, con los datos obtenidos de ambas grabaciones, se calculó la eficiencia de FRET (eFRET) y se graficó utilizando el software GraphPad Prism.

#### 2.15. Análisis estadístico

En los experimentos de microdiálisis *in vivo* para analizar la significancia para cada condición se utilizó *ANOVA* de dos vías para medidas repetidas, seguido del análisis *Bonferroni* post-test (\*\*\*p<0,0001; \*\*p<0,001; \*p<0,05).

Los datos en los experimentos de preferencia de lugar condicionado se expresaron como el tiempo total de permanencia (segundos) en el compartimento pareado a la droga y para evaluar la significancia se analizaron con *ANOVA* de una vía seguido del análisis *Newman Kuels* post-test (<sup>\*\*\*</sup>p<0,0001; <sup>\*\*</sup>p<0,001; <sup>\*</sup>p<0,05).

### Tabla 3. Construcciones

Templado	Construcciones	Partidores	Vectores
DA-D <sub>1</sub> -Rluc*	DA-D₁-Rluc	Rev: 5'-CGC GGT ACC GCC ACA GCG	pRluc-N1
		GCC GTC TGC TTG-3'	(CLONTECH)
		Forw: 5'-CTC GAA TTC GCC ACC ATG	
		AGG ACT CTG AAC ACC-3'	
DA-D <sub>1</sub> -YFP*	DA-D <sub>1</sub> -YFP	Rev: 5'-CGC GGT ACC GCC ACA GCG	pEYFP-N1
		GCC GTC TGC TTG-3'	(CLONTECH)
		Forw: 5'-CTC GAA TTC GCC ACC ATG	
		AGG ACT CTG AAC ACC-3'	
CRH-R <sub>2</sub>	CRH-R₂₄-wt	Rev: 5'-CGC GAA TTC TCA CAC AGC	pcDNA3.1
		GGC CGT CTG CTT GAT GC-3'	(CLONTECH)
		Forw: 5'-CTC GAA TTC GCC ACC ATG	
		GAC GCG GCA CTG CTC-3'	
CRH-R <sub>2a</sub> -wt	CRH-R <sub>2</sub> Rluc	Rev: 5'-CGC GGT ACC GCC ACA GCG	pRluc-N1
		GCC GTC TGC TTG-3'	(CLONTECH)
		Forw: 5'-CTC GAA TTC GCC ACC ATG	
		GAC GCG GCA CTG CTC-3'	
CRH-R <sub>2<sup>a</sup></sub> -wt	CRH-R <sub>2</sub> CFP	Rev: 5'-CGC GGT ACC GCC ACA GCG	pECFP-N1
		GCC GTC TGC TTG-3'	(CLONTECH)
		Forw: 5'-CTC GAA TTC GCC ACC ATG	
		GAC GCG GCA CTG CTC-3'	

Construcciones donadas por el Dr. Ciruela (Universidad de Barcelona, España). Se les adicionó una secuencia Kozak.

#### 3. RESULTADOS

## 3.1. Determinación de la interacción funcional entre los receptores de CRH-R<sub>2</sub> y

#### DA-D<sub>1</sub> en el VTA de ratas tratadas con cocaína

#### 3.1.1. Preferencia de lugar condicionado (CPP)

Primero se evaluó la conducta tipo adictiva de las ratas sometidas a los protocolos de administración repetida de cocaína y se comparó con la respuesta de ratas controles (ver materiales y métodos). El índice de conducta tipo adictivo se midió como el tiempo total de permanencia de las ratas en el compartimento pareado a la cocaína. Antes de comenzar con el condicionamiento se evaluó el tiempo de preferencia al compartimento que será pareado a la cocaína de ambos grupos (Pre-test), ratas controles y ratas antes de ser tratadas con cocaína (ratas control: 110,0 ± 10,9 segundos; ratas que serán tratadas con cocaína: 105,2 ± 10,9 segundos), entre estos tiempo de permanencia no se observaron diferencias significativas. Luego del período de condicionamiento sólo las ratas tratadas con cocaína mostraron un aumento significativo en el tiempo de permanencia en el compartimento pareado a cocaína (ratas controles: 103,8±11,6; ratas tratadas con cocaína:  $490,4\pm16,7$ ). Esto nos indica una conducta tipo adictiva debido a la alta preferencia por el compartimento pareado a la cocaína (ANOVA de una vía F(3,180)= 12,7, Newman Keuls post-test p<0,001) (Figura 3).

Veinticuatro horas después de evaluada la conducta tipo adictiva, las ratas se sometieron a experimentos de microdiálisis *in vivo*, en estos experimentos se tomaron 4 muestras basales de 10 minutos cada una, luego para determinar la posible interacción funcional entre los receptores de CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en el VTA

se perfundieron los distintos agonistas y/o antagonistas de cada receptor y se recolectó 5 muestras más.



**Figura 3. Preferencia de lugar condicionado a cocaína.** Muestra el tiempo de permanencia en el compartimento pareado a cocaína antes (Pre-test) y después (test) del condicionamiento. Los valores se presentan como el tiempo (segundos) ± EEM (n=12, para cada condición), *ANOVA* de una vía *Newman Keuls post-test* \*\*\*p< 0,001).

3.1.2. Niveles extracelulares de glutamato, DA y GABA en el VTA de ratas controles y ratas tratadas con cocaína, inducidos por la perfusión intra-VTA de CRH

Noventa minutos después de la implantación de la sonda en el VTA de ratas controles o ratas tratadas con cocaína, se recolectaron 4 basales, de 10 minutos cada uno. En todos los experimentos de microdiálisis realizados en esta tesis no se observaron cambios significativos de los niveles basales de glutamato, DA y GABA recolectados.

Luego de la recolección de los basales se procedió a la perfusión intra-VTA de CRH (10µM), esta produjo un aumento significativo en los niveles extracelulares de glutamato en el VTA de ratas tratadas con cocaína respecto a sus propios basales (p<0,0001 (50 minutos) y p<0,05 (60 minutos) (Figura 4A). Este aumento fue significativamente mayor comparado con las ratas controles (p<0,0001 (50 minutos); p<0,05 (60 minutos) (Figura 4A), en las cuales no se produjo cambios en los niveles extracelulares de glutamato en el VTA (Figura 4A). En estas mismas muestras la perfusión intra-VTA de CRH produjo un aumento significativo de los niveles extracelulares de DA en el VTA respecto a sus propios basales sólo en ratas tratadas con cocaína (p<0,0001 (50 minutos) y p<0,05 (60 minutos) (Figura 4B). Este incremento fue significativamente mayor comparado con las ratas controles (p< 0,0001 (50 minutos) y p<0,05 (60 min), en las cuales el CRH no produjo cambios en los niveles extracelulares de DA en el VTA (Figura 4B). Respecto a los niveles extracelulares de GABA en el VTA, la perfusión de CRH intra-VTA en ratas controles produjo un aumento significativo en los niveles extracelulares de GABA en el VTA de rata con respecto a sus propios basales, este aumento se mantuvo por 30 minutos (p<0,05 (50 minutos) y p<0,0001 (60 y 70 minutos) (Figura 4C). Por otra parte, la perfusión de CRH intra-VTA en las ratas tratadas con cocaína no produjo cambios significativos en los niveles extracelulares de GABA en el VTA de rata con respecto a sus propios basales (Figura 4C). Se observó con mayor claridad que la perfusión de CRH intra-VTA produjo cambios significativos sólo de los niveles extracelulares de GABA en el VTA de ratas controles (p<0,05 (50 minutos) y p<0,0001 (60 y 70 minutos) (Figura 4C).



Figura 4. La perfusión intra VTA de CRH aumentó los niveles de glutamato, DA y GABA sólo en el VTA de ratas tratadas con cocaína. Niveles extracelulares de glutamato (A). DA (B) y GABA (C) en el VTA de ratas controles (O) y ratas tratadas con cocaína ( $\Box$ ), antes y después de la perfusión intra-VTA de CRH (10µM). Los valores se presentan como el promedio de niveles extracelulares de DA expresado en fmol/µl; glutamato y GABA expresados en pmol/µl ± EEM (n=5, para cada condición). Para el análisis estadístico se utilizó *ANOVA* de dos vías para medidas repetidas, seguido del análisis *Bonferroni post-test*.

Como señalamos anteriormente, CRH es un neuropéptido distribuido en regiones límbicas del cerebro y actúa sobres dos tipos de receptores CRH-R<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub>. Por lo que, para determinar cuál es el receptor involucrado en el aumento de los niveles de glutamato en las ratas tratadas con cocaína (Figura 4A), se perfundió intra-VTA en forma concomitante CRH con CP154526, antagonista selectivo para receptores CRH-R<sub>1</sub> o con K41498, antagonista selectivo para receptores CRH-R<sub>2</sub>. La perfusión concomitante de K41498 y CRH, mostró que la presencia del antagonista selectivo para receptores CRH-R<sub>2</sub> bloquea el aumento inducido por CRH de los niveles extracelulares de glutamato y de DA en el VTA de ratas tratadas con cocaína (Figura 5A y 5B, respectivamente). En el caso de las ratas controles no se produjo cambios en los niveles extracelulares de glutamato ni de DA en el VTA (Figura 5A y 5B, respectivamente).

La perfusión intra-VTA concomitante del antagonista CP154526 (1µM) y CRH, mostró que aun en presencia del antagonista selectivo para receptores CRH-R<sub>1</sub>, CRH es capaz de inducir un aumento significativo de los niveles extracelulares de glutamato (p<0,005 (50, 60 y 70 minutos) (Figura 5C), pero si es capaz de bloquear niveles extracelulares de DA en ratas tratadas con cocaína (Figura 5D). Al comparar la magnitud del efecto sobre los niveles extracelulares de glutamato en VTA de ratas tratadas con cocaína, tras la perfusión intra-VTA de CRH (Figura 4A) versus la perfusión de CRH en presencia del antagonista CRH-R<sub>1</sub> (Figura 5C), no encontramos diferencias significativas. Por lo que el efecto en la sensibilización de los niveles extracelulares de glutamato se debería a la activación de receptores CRH-R<sub>2</sub> (Figura 5B) Por otra parte, es interesante el resultado obtenido en los niveles extracelulares de DA en los experimento en los cuales se perfundió CRH en presencia del antagonista a receptores CRH-R<sub>1</sub> o el antagonista a receptores CRH-R<sub>1</sub>, ya que en ambos casos estos bloquean el efecto inducido por CRH en el VTA de ratas tratadas con cocaína (Figura 5D). Para determinar si existe interacción entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>, se perfundió intra-VTA el antagonista selectivo SCH23390 (1µM), para receptores DA-D<sub>1</sub>. La perfusión concomitante del antagonista SCH23390 y CRH, mostró que la presencia del antagonista selectivo para receptores DA-D<sub>1</sub> bloquea el aumento inducido por CRH de los niveles extracelulares de glutamato y de DA en el VTA de ratas tratadas con cocaína (Figura 6A y 6B, respectivamente). En el caso de las ratas controles no produjo cambios de los niveles extracelulares de glutamato ni de DA en el VTA (Figura 6A y 6B, respectivamente).



Figura 5. La perfusión intra-VTA de K41498, antagonista de los receptores CRH-R2, bloquea el aumento de glutamato y de DA inducido por CRH en el VTA de ratas tratadas con cocaína. Niveles extracelulares de glutamato (A) y DA (B) en presencia de K41498. Niveles extracelulares de glutamato (C) y DA (D) en presencia de CP154526 en el VTA de ratas controles (O) y ratas tratadas con cocaína ( $\Box$ ), antes y después de la perfusión intra-VTA de CRH (10µM). Los valores se presentan como el promedio de niveles extracelulares de DA expresado en fmol/µl o glutamato expresado en pmol/µl ± EEM (n=4, para cada condición). Para el análisis estadístico se utilizó *ANOVA* de dos vías para medidas repetidas, seguido del análisis *Bonferroni post-test*.



Figura 6. la perfusión intra VTA de SCH23390, antagonista de los receptores DA-D<sub>1</sub>, bloquea el aumento de glutamato y de DA inducido por CRH en el VTA de ratas tratadas con cocaína. Niveles extracelulares de glutamato (A) y de DA (B) en presencia de SCH23390 en el VTA de ratas controles (O) y ratas tratadas con cocaína ( $\Box$ ), antes y después de la perfusión intra-VTA de CRH (10µM). Los valores se presentan como el promedio de niveles extracelulares de DA (fmol/µl) o de glutamato (pmol/µl) ± EEM (n=5, para cada condición). Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías para medidas repetidas, seguido del análisis *Bonferroni post-test*.

3.1.3. Niveles extracelulares de glutamato y DA en el VTA inducidos por la perfusión intra-VTA de SKF38392 o SKF83822 en ratas controles y ratas tratadas con cocaína

En la literatura se ha descrito que la formación de heterómeros puede cambiar la afinidad de los ligando por los receptores. Por lo que, utilizamos 2 agonistas selectivos de los receptores de DA-D<sub>1</sub>, SKF38392 o SKF83822.

La perfusión intra-VTA del agonista SKF38392 (10µM) produjo un aumento significativo de los niveles extracelulares de glutamato en el VTA, sólo de ratas tratadas con cocaína respecto a sus propios basales a las ratas controles (p<0,05 (60 minutos), en donde el agonista no produjo cambios en los niveles extracelulares de glutamato (Figura 7A). Por otro lado, la perfusión del agonista SKF-83822 (10µM), también produjo un aumento significativo de los niveles extracelulares de glutamato en el VTA sólo de ratas tratadas con cocaína respecto a sus propios basales y a las ratas controles (p<0,005 (60 minutos) (7C, respectivamente),

Al analizar la magnitud del cambio entre ambos agonistas se observó que la perfusión de SKF38392 induce un aumento significativamente menor de los niveles extracelulares de glutamato que SKF83822 (p<0,05 (50, 60 y 70minutos). En estas mismas muestras tanto la perfusión intra-VTA de SKF-38392 (10µM) como de SKF83822 (10µM), no produjo cambios en los niveles extracelulares de DA (Figura 7B y 7D, respectivamente).

Para evaluar la selectividad de los agonistas a receptores DA-D<sub>1</sub>, se perfundió intra-VTA el antagonista selectivo para receptores DA-D<sub>1</sub>SCH23390 (1 $\mu$ M), La perfusión concomitante de SCH23390 y SKF38392 o SCH23390 y SKF83822, mostró que la presencia del antagonista selectivo para receptores DA-D<sub>1</sub> bloquea el aumento inducido por los agonistas de los niveles extracelulares de glutamato en el VTA de ratas tratadas con cocaína (Figura 8A y 8B, respectivamente). Respecto a los niveles extracelulares de DA en el VTA de ambos grupos de ratas no se produjo cambios.

Para determinar si existe interacción entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>, se perfundió intra-VTA los agonistas selectivos para receptores DA-D<sub>1</sub>, SKF38392 o SKF83822. Estos agonistas se perfundieron intra-VTA en presencia del antagonista selectivo K41498 (1µM) para receptores CRH-R<sub>2</sub>. La perfusión intra-VTA del antagonista per se no produjo cambios significativos con respecto a los niveles basales de glutamato y DA. La perfusión concomitante tanto de K41498 con SKF38392 como de K41498 con SKF83822, mostró que la presencia del antagonista selectivo para receptores CRH-R<sub>2</sub> bloquea el aumento inducido por inducido por cualquiera de los agonistas de los niveles extracelulares de glutamato en el VTA de ratas tratadas con cocaína (Figura 8C y 8D, respectivamente). Respecto a los niveles extracelulares de glutamato en el VTA de ratas controles no se observó cambios significativos de los agonistas en presencia del antagonista K41498 (Figura 8C y 8D, respectivamente). Además, al analizar los niveles extracelulares de DA en el VTA de ambos grupos de ratas no se observó cambios.



Figura 7. La perfusión intra VTA de SKF38392 o SKF83822, agonistas de los receptores DA-D<sub>1</sub>, aumentó los niveles extracelulares solo de glutamato en el VTA de ratas tratadas con cocaína. Niveles extracelulares de glutamato (A) y de DA (B) en el VTA de ratas controles y ratas tratadas con cocaína, antes y después de la perfusión intra-VTA de SKF38392 (10 $\mu$ M). Niveles extracelulares de glutamato (C) y de DA en el VTA de ratas controles (O) y ratas tratadas con cocaína ( $\Box$ ), antes y después de la perfusión intra-VTA de SKF83822 (10 $\mu$ M). Los valores se presentan como el promedio de niveles extracelulares de DA expresado en fmol/ $\mu$ l o glutamato expresado en pmol/ $\mu$ l ± EEM (n=5, para cada condición). Para el análisis estadístico se utilizó *ANOVA* de dos vías para medidas repetidas, seguido del análisis *Bonferroni post-test*.



Figura 8. La perfusión intra VTA de los antagonistas SCH23390 o K41498 bloqueó el aumento en los niveles extracelulares de glutamato inducidos por SKF38392 o SKF83822 en el VTA de ratas tratadas con cocaína. Niveles extracelulares de glutamato en el VTA de ratas controles y ratas tratadas con cocaína, antes y después de la perfusión intra-VTA de SKF38392(10 $\mu$ M) (A) o SKF83822 (10 $\mu$ M) (B), en presencia del antagonista SCH23390, Niveles extracelulares de glutamato en el VTA de ratas controles (O) y ratas tratadas con cocaína ( $\Box$ ), antes y después de la perfusión intra-VTA de SKF83822 (10 $\mu$ M) (C) o SKF83822 (10 $\mu$ M) (D), en presencia del antagonista K41498. Los valores se presentan como el promedio de niveles extracelulares de DA expresado en fmol/ $\mu$ l o glutamato expresado en pmol/ $\mu$ l ± EEM (n=5, para cada condición). Para el análisis estadístico se utilizó *ANOVA* de dos vías para medidas repetidas, seguido del análisis *Bonferroni post-test*.

3.1.4. Cambios neuroquímicos en el VTA inducidos por la perfusión intra-VTA de CRH + SKF38392 o CRH + SKF3822 en ratas controles y ratas tratadas con cocaína

Para evaluar si la activación de ambos receptores (CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>) produce un efecto potenciador de la liberación de glutamato en el VTA de rata, se realizó la perfusión simultánea intra-VTA del agonista selectivo de los receptores de DA-D<sub>1</sub>, SKF38392 en presencia de CRH o del agonista selectivo SKF83822 en presencia de CRH.

La perfusión intra-VTA de SKF38392 (10µM) más CRH (10µM) produjo un aumento significativo y sostenido en los niveles extracelulares de glutamato (p<0.001 (50, 60, 80 y 90 minutos) y p<0,05 (70 minutos) y de DA (p<0,001 (50 minutos) y p<0,0001 (60, 70 y 80 minutos), en el VTA sólo de ratas tratadas con cocaína respecto a sus propios basales y a las ratas tratadas con cocaína (Figura 9<sup>ª</sup> y 9B, respectivamente). Por otra parte, la perfusión intra-VTA concomitante de SKF83822 (10µM) y CRH (10µM), no induce cambios en los niveles extracelulares de DA, pero si produjo un aumento significativo y sostenido en los niveles extracelulares de glutamato en el VTA sólo de ratas tratadas con cocaína respecto a sus propios basales y respecto a las ratas controles (p<0,001 (50 y 60 minutos); p<0,05 (70 minutos) (Figura 9C y 9D, respectivamente). Cabe señalar que al comparar la magnitud del aumento inducido por la perfusión intra-VTA concomitante de SKF83822 y CRH versus la perfusión intra-VTA concomitante de SKF38392 y CRH de los niveles extracelulares de glutamato en el VTA de ratas tratadas con cocaína, esta ultima es significativamente menor (p<0.05 (50, 60 v 80 minutos) (Figura 9E). La perfusión intra-VTA de las mezclas de agonistas muestra que la combinación de SKF38392 más CRH induce una potenciación en el aumento de los niveles extracelulares de glutamato sólo en las ratas tratadas con cocaína, lo que sugiere un efecto sinérgico o cooperatividad de los receptores al ser activados simultáneamente.

Para evaluar si el efecto potenciador en la liberación de glutamato en el VTA se debe a una interacción entre los receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub>, se realizó la perfusión simultanea intra-VTA del agonista selectivo de los receptores de DA-D<sub>1</sub>, SKF38392 más CRH o del agonista selectivo SKF83822 más CRH, en presencia del antagonista selectivo de los receptores DA-D<sub>1</sub>, SCH23390. Estos experimentos mostraron que en ambas condiciones los niveles extracelulares de glutamato recolectados desde el VTA de ratas tratadas con cocaína no fueron significativamente diferentes de las ratas controles (Figura 10A). La perfusión intra-VTA de SCH23390 (1µM) bloqueo el aumento sostenido, inducido por la perfusión intra-VTA de SKF38392 (10µM) más CRH, de los niveles extracelulares de glutamato en VTA de ratas tratadas con cocaína (Figura 10A). Lo mismo se observó cuando se perfundió perfusión intra-VTA de SKF-83822 (10µM) más CRH (10µM) en presencia de SCH23390 (1µM) (Figura 10B).

Por otra parte, los mismo observamos cuando se perfundió intra-VTA el antagonista K-41498 (1µM), concomitante con SKF-38392 (10µM) más CRH (10µM) o la perfusión de SKF-83822 (10µM) más CRH (10µM), quedando en evidencia que el antagonista de los receptores CRH-R2 es capaz de bloquear el aumento sostenido de los niveles extracelulares de glutamato inducido por los agonistas en el VTA de ratas tratadas con cocaína.



Figura 9. Efecto de la perfusión intra-VTA de CRH+SKF38392 o CRH+SKF83822 sobre los niveles extracelulares de glutamato y DA en el VTA de ratas controles y ratas tratadas con cocaína. Niveles extracelulares de glutamato (A) y de DA (B) en el VTA de ratas controles y de ratas tratadas con cocaína, durante la perfusión intra-VTA de CRH ( $10\mu$ M)+SKF38392 ( $10\mu$ M). Niveles extracelulares de glutamato (C) y de DA (D) en el VTA de controles (O) y ratas tratadas con cocaína ( $\Box$ ), durante la perfusión intra-VTA de controles (O) y ratas tratadas con cocaína ( $\Box$ ), durante la perfusión intra-VTA de CRH ( $10\mu$ M)+SKF83822 ( $10\mu$ M).. Los valores se presentan como el promedio de niveles extracelulares de DA expresado en fmol/µl yo glutamato expresado en pmol/µl ± EEM (n=5, para cada condición). Para el análisis estadístico se utilizó *ANOVA* de dos vías para medidas repetidas, seguido del análisis *Bonferroni post-test*.



Figura 10. La perfusión intra VTA de SCH23390 o K41498 bloqueó el aumento en los niveles de glutamato y DA inducidos por la perfusión de CRH+SKF38392 o CRH+SKF83822. Niveles extracelulares de glutamato en el VTA de ratas controles y ratas tratadas con cocaína, antes y después de la perfusión intra-VTA de SKF-38392(10 $\mu$ M) (A) o SKF83822 (10 $\mu$ M) (B), en presencia del antagonista SCH23390 (1 $\mu$ M). Niveles extracelulares de glutamato en el VTA de ratas controles (O) y ratas tratadas con cocaína ( $\Box$ ), antes y después de la perfusión intra-VTA de SKF83822 (10 $\mu$ M) (C) o SKF83822 (10 $\mu$ M) (D), en presencia del antagonista K41498 (1 $\mu$ M). Los valores se presentan como el promedio de niveles extracelulares de glutamato en pmol/ $\mu$ l ± EEM (n=5, para cada condición). Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías para medidas repetidas, seguido del análisis Bonferroni post-test.

# 3.2. Determinación de la localización de los receptores de CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en el VTA de ratas controles y en ratas tratadas con cocaína

Para desarrollar este objetivo se realizaron experimentos de inmunofluorescencia (IF) en sinaptosomas del VTA de ratas controles y de ratas tratadas con cocaína con un período de abstinencia de un día. Primero montamos la preparación de sinaptosomas del VTA de rata desprovistos de elementos postsinápticos (ver materiales y métodos) para determinar la localización de los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>. Para controlar la calidad de la preparación de sinaptosomas se realizaron experimentos de western blot (WB) evaluando con esto la presencia de la proteína Sinapsina I en sinaptosomas de cuerpo estriado de ratas control. Esta proteína es una ATPasa específica de neuronas, fundamental para la unión de las vesículas presinápticas, manteniendo las vesículas almacenadas cerca de la zona activa de la sinapsis, listas para su liberación, por lo que es un buen marcador de terminales sinápticos. En la Figura 11A se muestra la presencia de la proteína Sinapsina I, la cual se mantiene en cantidades similares en las distintas fracciones subcelulares obtenidas de la preparación de sinaptosomas del cuerpo estriado (carriles 1 al 6 y el carril 8), con una clara disminución en el carril 7 correspondiente al gradiente que no contiene los sinaptosomas. Además, en las misma muestras se evaluó una segunda proteína marcadora de terminales presinápticos SNAP25 (sinaptosomal-associated protein 25), esta proteína corresponde a uno de los componentes del complejo SNARE. EL WB contra la proteína SNAP25 muestra cantidades similares en las distintas fracciones subcelulares obtenidas de la preparación de sinaptosomas del cuerpo estriado (carriles 1 al 6 y el carril 8), con una clara disminución en el carril 7

correspondiente al gradiente que no contiene los sinaptosomas (Figura 11B). Finalmente, para controlar que la preparación es preferentemente presináptica se determinó la presencia de la proteína PSD95 como marcador postsináptico, en las distintas fracciones subcelulares (Figura 11C, carriles 1 al 7) obtenidas de la centrifugación diferencial y del gradiente de *Percoll* hasta llegar a la preparación final donde se obtienen los sinaptosomas purificados (Figura 11C, carril 8). Nuestros resultados muestran que a medida que se purifican los sinaptosomas, disminuye la proteína postsináptica PSD95. Otra estrategia, para demostrar que los sinaptosomas no poseen elemento postsinápticos fusionados al presináptico, y con el fin de lograr determinar con mayor resolución la estructura y localización de los receptores en terminales del VTA de rata, fueron los experimentos de microscopía electrónica e Inmunogold (ver materiales y métodos). En la Figura 12A y 12B se muestra la ultraestructura de los sinaptosomas del VTA tanto de ratas controles como de ratas tratadas con cocaína, se observa terminales sinápticos sellados con vesículas, libre de estructuras postsinápticas. Por otra parte, no se observaron diferencias aparente entre los sinaptosomas de VTA de ratas controles versus ratas tratadas con cocaína (Figura 12A y 12B, respectivamente). Al realizar los experimentos de Inmunogold nos permitió observar la presencia de los receptores y la ultraestructura de nuestra preparación presináptica es decir, receptores presentes en sinaptosomas del VTA de ratas controles y de ratas tratadas con cocaína (Figura 13).



**Figura 11.** *Western Blot* en sinaptosomas del Cuerpo estriado de rata. A) Contra la proteína Sinapsina I, no se observa diferencias entre las fracciones subcelulares obtenidas (carriles 1 al 4, 6 y 8) y una disminución en las fracciones 5 y 7 (1: Homogenizado; 2: 1º Sobrenadante (SN); 3: 1º Pellet (P): 4: 2º P; 5; 2º SN; 6: 3º P; 7: porción del gradiente de 3% y 8: Sinaptosomas purificados presinápticamente). B) Contra la proteína SNAP25 no se observa diferencias entre las fracciones subcelulares (carriles 1 al 4, 6 y 8) y una disminución en las fracciones 5 y 7 y C) contra la proteína PSD95 en el cual se observó una disminución en las distintas fracciones subcelulares obtenidas de la preparación de sinaptosomas (carriles 1 al 7) hasta obtener una muy baja cantidad de proteína en los sinaptosomas puros del mismo núcleo (carril 8).


**Figura 12. Ultra estructura de sinaptosomas del VTA de ratas. A)** Sinaptosomas del VTA de ratas controles y **B)** Sinaptosomas del VTA de ratas tratadas con cocaína. Los sinaptosomas se fijaron con PFA/Glutaraldehído y se postfijaron con tetróxido con acetato de uranilo, ya deshidratados se preincluyeron en EPON. La observación de las muestras se realizó en un Microscopio de transmisión (*Philips, modelo Tecnai 12 biotween A80kV*).



**Figura 13.** Detección por microscopia electrónica de los receptores CRH-R2 y DA-D1 en sinaptosomas del VTA de rata A) y B) *Inmunogold* contra receptores DA-D1 (anti-DA-D<sub>1</sub>, *anti-rabbit*, Sigma aldrich, 1:10) en sinaptosomas del VTA de ratas controles y tratadas con cocaína, respectivamente; C) y D) *Inmunogold* contra receptores CRH-R2 (anti-CRHR<sub>2</sub>, *anti-rabbit*, Sigma aldrich, 1:10) en sinaptosomas del VTA de ratas con cocaína, respectivamente; E) y D) *Inmunogold* contra receptores y tratadas con cocaína, respectivamente; E) y F) *Inmunogold* control (se realizó una incubación sin anticuerpo primario) en sinaptosomas del VTA de ratas controles y tratadas con cocaína, respectivamente, z ontroles y tratadas con cocaína, respectivamente. Como anticuerpo secundario se utilizó Proteína A 20nm (Sigma aldrich, 1:100). La observación de las muestras se realizó en un Microscopio de transmisión (*Philips, modelo Tecnai 12 biotween A80kV*).

Por otro lado, se sabe que el VTA es un área del cerebro que presenta alta cantidad de fibras, por lo que es difícil poder observar con experimentos de IF en el VTA la localización y presencia de receptores. Sin embargo, la resolución dada por la microscopia electrónica parece ser una importante e interesante herramienta, por esta razón realizamos experimentos preliminares de ultraestructura del VTA de 2 ratas controles y 2 ratas tratadas con cocaína (Figura 14A y 14B), al analizar 6 planos observamos sinapsis de tipo excitatoria en el VTA de las ratas tratadas con cocaína(Figura 14B), para poder confirmar esta observación será necesario aumentar el número de estos experimentos y verificar en varios planos si lo que ocurres es un aumento en este tipo de sinapsis.

Una vez confirmado que no existen elementos postsinápticos en nuestros sinaptosomas y gracias al desarrollo comercial de anticuerpos específicos para los transportadores vesiculares de glutamato vGluT1 y vGluT2 que permiten la identificación de terminales glutamatérgicos y su origen, cortical (vGluT1) o subcortical (vGluT2), se analizó mediante *WB* la presencia de ambos transportadores en sinaptosomas provenientes de distintas áreas del cerebro: VTA, CPF, SL, Nac y Cuerpo Estriado. Se observó la presencia de vGluT1 y de vGluT2 en todos los núcleos analizados (datos no mostrados).



**Figura 14. Ultraestructura de VTA de rata. A)** VTA de ratas controles y **B)** VTA de ratas tratadas con cocaína. Las ratas se anestesiaron con Hidrato de Cloral 16% y se perfundieron intracardialmente de solución de fijación (PFA/Glutaraldehído), se postfijó con tetróxido de osmio, ya deshidratadas se preincluyó en EPON. La observación de las muestras se realizó en un Microscopio de transmisión (*Philips, modelo Tecnai 12 biotween A80kV*).

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre la pureza presináptica de la preparación de sinaptosomas, se realizó el montaje de la técnica de IF en los sinaptosomas de VTA, en colaboración con el Dr. Francisco Ciruela, Universitat de Barcelona, España. En estos experimentos se utilizaron cerebros de ratas controles. Primero, se realizaron experimento de IF contra Sinapsina I como marcador de terminales sinápticos y de los transportadores vGluT1/vGluT2 como marcador de terminales glutamatérgicos. Estos experimentos muestran que existe co-localización entre los transportadores vesiculares de glutamato vGluT1/vGluT2 con Sinapsina I de un 60,7 % (Figura 15A), lo que demuestra que la preparación de sinaptosomas corresponde a botones presinápticos obtenidos tras el resellado espontáneo de la membrana plasmática durante la preparación. Para corroborar esto, se realizó doble IF para PSD95 como marcador postsináptico y Sinapsina I, observándose una baja inmunoreactividad para la proteína postsináptica PSD-95 sin co-localización con Sinapsina I en los sinaptosomas del VTA de rata (Figura 15B), lo que corrobora la pureza de la preparación, permitiendo determinar la localización presináptica de los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>.

Se ha mostrado en la literatura que los transportadores vesiculares de glutamato no co-existen en los mismos terminales sinápticos. Por lo tanto, se realizaron experimentos de doble IF para vGluT1 (*anti-guinea pig,* Chemicon) y vGluT2 (*anti-mouse,* NeuroMab) en sinaptosomas del VTA de ratas controles. Los resultados muestran que no existe co-localización de ambos transportadores, apoyando así lo descrito en la literatura. Además, tanto el análisis cualitativo como cuantitativo indica

que el 68,4% de los sinaptosomas marcados corresponde a terminales de origen subcortical (vGluT2 positivo) (Figura 15C).

Para evaluar la localización de los receptores se realizaron experimentos de doble IF, en estos resultados observamos que no existe co-localización entre los receptores de CRH-R<sub>2</sub> y vGluT1 en sinaptosomas del VTA de rata (Figura 16A). Por otro lado, al realizar la IF para los receptores CRH-R<sub>2</sub> y vGluT2 se observó co-localización, lo que indica que la localización de los receptores CRH-R<sub>2</sub> (Figura 16B) es en terminales glutamatérgicos provenientes de núcleos subcorticales. Para determinar la localización de los receptores DA-D<sub>1</sub> en terminales glutamatérgicos realizamos doble IF. Esto resultados muestran este receptor co-localiza tanto con vGluT1 (Figura 17A) como con vGluT2 (Figura 17B), estos nos indica que este receptor se localiza tanto en terminales glutamatérgicos corticales como subcorticales.

Posteriormente, se realizaron experimentos de doble IF para los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>; estos resultados muestran co-localización de ambos receptores (Figura 18), lo que sugiere que hay receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> se localizan en los mismos terminales glutamatérgicos. La metodología de IF en sinaptosomas nos ha permitido obtener datos interesantes sobre la localización de los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en terminales glutamatérgicos del VTA de ratas, de origen subcortical. Por lo que, se realizaron experimentos de triple IF para vGluT2/CRH-R<sub>2</sub>/DA-D<sub>1</sub> y para vGluT1/CRH-R<sub>2</sub>/DA-D<sub>1</sub>. Estos resultados muestran que existe un 34,1% de la población de terminales glutamatérgicos de origen subcortical que poseen ambos receptores (Figura 19A y 19B, respectivamente).



**Figura 15. Doble inmunofluorescencia en sinaptosomas de VTA de rata. A)** Contra los transportadores vGluT1/vGluT2 + Sinapsina I (1:500 *anti-mouse*, Neuromab y 1:1000 *anti-rabbit*, Santa cruz, respectivamente), **B)** Contra Sinapsina I + PSD95 (1:1000 *anti-rabbit*, Santa Cruz y 1:200 *anti-mouse*, Neuromab, respectivamente) y **C)** contra vGluT1 + vGluT2 (1:500 *anti-guinea pig*, Chemicon y 1:500 *anti-mouse*, Neuromab, respectivamente). Como anticuerpos secundarios se utilizaron AlexaFluor 488, FitC y AlexaFluor 594. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal Olympus Fluoview 1000 con objetivo de 100x.



**Figura 16.** Localización de receptores CRH-R<sub>2</sub> en terminales glutamatérgicos del VTA de rata. A) Contra vGluT1+CRH-R<sub>2</sub> (1:500 *anti-mouse*, Neuromab y 1:500 *anti-goat* N-20, Santa cruz, respectivamente), **B)** Contra vGluT2+CRH-R<sub>2</sub> (1:500 *anti-mouse*, Neuromab y 1:500 *anti-goat* N-20, Santa cruz, respectivamente). Como anticuerpos secundarios se utilizaron AlexaFluor 488 y AlexaFluor 594. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal Olympus Fluoview 1000 con objetivo de 100x.



**Figura 17.** Localización de receptores DA-D<sub>1</sub> en terminales glutamatérgicos del VTA de rata. A) Contra vGluT1+DA-D<sub>1</sub> (1:500 *anti-mouse*, Neuromab y 1:500 *anti-rabbit*, Santa Cruz, respectivamente) **B)** Contra vGluT2+DA-D<sub>1</sub> (1:500 *anti-mouse*, Neuromab y 1:500 *anti-rabbit*, Santa Cruz, respectivamente). Como anticuerpos secundarios se utilizaron AlexaFluor 488 y AlexaFluor 594. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal *Olympus Fluoview* 1000 con objetivo de 100x



**Figura 18. Co-existencia de los receptores de DA-D**<sub>1</sub> **y CRH-R**<sub>2</sub> **sinaptosomas del VTA de rata.** Contra DA-D<sub>1</sub>+CRH-R<sub>2</sub> (1:500 *anti-rabbit* y 1:500 *anti-goat* N-20, Santa Cruz, respectivamente). Como anticuerpos secundarios se utilizaron AlexaFluor 488 y AlexaFluor 594. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal Olympus Fluoview 1000 con objetivo de 100x.



**Figura 19.** Localización de receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub> en terminales glutamatérgicos subcorticales del VTA de rata. A) Contra DA-D<sub>1</sub>+CRH-R<sub>2</sub>+vGluT2 (1:500 *anti-rabbit*, 1:500 *anti-goat* N-20, Santa Cruz 1:500 *anti-mouse*, respectivamente) y **B)** Zoom de la triple IF contra DA-D<sub>1</sub>+CRH-R<sub>2</sub>+vGluT2. Como anticuerpos secundarios se utilizaron AlexaFluor 488, AlexaFluor 546 y AlexaFluor 637. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal *Olympus Fluoview* 1000 con objetivo de 100x.

2.0un

vGluT2

2.0

CRF-R2

2.0µm

2.0µ

Merge

# 3.3. Interacción física o molecular entre los receptores de CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>

#### 3.3.1. Experimentos de Co-inmunoprecipitación

Para determinar si la interacción entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en sinaptosomas del VTA de ratas ocurre, primero relazamos experimentos de WB en los sinaptosomas de VTA de ratas controles y ratas tratadas con cocaína. Nuestros resultados muestran presencia de los receptores CRH-R<sub>2</sub> en los sinaptosomas de VTA tanto de ratas controles como ratas tratadas con cocaína, no hay diferencias significativas en la cantidad presentes de estos (Figura 20A). Por otro lado, al evaluar la presencia de los receptores DA-D<sub>1</sub> en ambos grupos, tampoco se observaron diferencia significativas en la cantidad de receptores (Figura 20B). Luego se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación, en estos experimentos nuestros resultados muestran que existe la formación de un complejo heteromérico entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>, en sinaptosomas del VTA de ratas. Esto es observado tanto cuando se inmunoprecipitó contra receptores CRH-R<sub>2</sub> (Figura 21A) como cuando se inmunoprecipitó contra los receptores DA-D<sub>1</sub> (Figura 21B). Como control realizamos inmunoprecipitacion con Sinapsina I y WB contra la misma en muestra de inmunoprecipitados con CRH-R<sub>2</sub>, mostrando que la formación del complejo es sólo entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en sinaptosomas del VTA de ratas (Figura 21C), con un aumento significativo de este complejo heteromérico en las ratas tratadas con cocaína cuando se inmunoprecipitó contra receptores DA-D<sub>1</sub> o CRH-R<sub>2</sub> (Figuras 21D y 21E, respectivamente). Nosotros además, observamos que no existen cambios en las cantidades de los receptores cuando se compararon ratas controles versus ratas tratadas con cocaína. Basado en esto, pensamos que para que ocurra la interacción de los receptores en la membrana de los terminales sinápticos del VTA de rata, los receptores deben movilizarse juntos a la membrana. Para determinar si los receptores CRH-R2 aumenta su localización en la membrana de los terminales glutamatérgicos del VTA de ratas tratadas con cocaína, se realizaron experimentos de entrecruzamiento de las proteínas de membrana. Luego realizamos *WB* contra el receptor CRH-R<sub>2</sub> en sinaptosomas de ratas controles y ratas tratadas con cocaína. Nuestros resultados muestran que aumenta considerablemente la localización los receptores CRH-R<sub>2</sub> en la superficie celular en los sinaptosomas de VTA de ratas tratadas con cocaína respecto a los receptores CRH-R<sub>2</sub> de los sinaptosomas de ratas controles (Figura 20C, carril 5 y 6, respectivamente).





**Figura 20.** Presencia de los receptores de DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub> en sinaptosomas de VTA de rata. A) Arriba WB contra los receptores CRH-R<sub>2</sub>, abajo como control de carga WB contra SNAP25; **B**) Arriba WB contra los receptores DA-D<sub>1</sub>, abajo como control de carga WB contra SNAP25 (1: sinaptosomas de VTA de ratas controles (SVTA-C 25  $\mu$ g); **2:** sinaptosomas de VTA de ratas tratadas con cocaína (SVTA-CC 25  $\mu$ g); **3:** SVTA-C (50  $\mu$ g) y **4:** SVTA-CC (50  $\mu$ g) y **C**) WB contra receptores CRH-R<sub>2</sub> luego de Crosslink de proteínas de membrana (1: SVTA-CC antes del Crosslink; **2:** SVTA-C antes del Crosslink; **3:** sobrenadante de SVTA-CC con Crosslink; **4:** sobrenadante de SVTA-C con Crosslink; **5:** Crosslink de SVTA-CC y **6:** Crosslink de SVTA-C).



**Figura 21.** Interacción entre receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en sinaptosomas del VTA de rata. A) Muestra la inmunoprecipitación (IP) contra los receptores DA-D<sub>1</sub> y el *WB* contra los receptores CRH-R<sub>2</sub> (flecha señala 55 kDa) (**1**: SVTA-C; **2**: SVTA-CC; **3**: sinaptosomas del Cuerpo Estriado de ratas controles (SE-C) y **4**: sinaptosomas del Cuerpo Estriado de ratas tratadas con cocaína (SE-CC); **B**) Muestra la IP contra los receptores CRH-R<sub>2</sub> y el *WB* contra los receptores DA-D<sub>1</sub> (flecha señala 70 kDa) (**1**: SE-C; **2**: SVTA-C; **3**: SVTA-CC y **4**: SE-CC); **C**) Muestra la IP contra los receptores CRH-R<sub>2</sub> en los carriles 1 y 2 (SVTA-C y SVTA-CC, respectivamente) y la IP de Sinapsina I en los carriles 3 y 4 (SVTA-C y SVTA-CC, respectivamente) y el *WB* contra Sinapsina I (80 kDa). En todos los casos se muestra a la derecha sus respectivos *Input*; **D**) y **E**) Muestran la cuantificación de las veces de aumento del complejo heteromérico de los WB correspondientes a la figura A y B, respectivamente, donde se observa un aumento significativo de la interacción entre los recetores CRH.R2 y DA-D1 en sinaptosomas de ratas tratadas con cocaína.

### 3.3.2. Interacción BRET y FRET/FRAP

Para demostrar una interacción física directa entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>, se realizaron experimentos de BRET en células HEK293 vivas, las cuales se transfectaron con los cDNA que codifican para las proteínas de fusión CRH-R<sub>2</sub>-Rluc y DA-D<sub>1</sub>-YFP. Después de la transfección, la expresión de receptores se observó tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma de las células (Figura 22A). En BRET cuando ocurre la transferencia de energía entre dos proteínas que interactúan específica y directamente se alcanza una meseta. Nuestros resultados de BRET muestran una curva para el par CRH-R<sub>2</sub>-Rluc/DA-D<sub>1</sub>-YFP, cuando se co-transfectaron cantidades constantes del cDNA para el constructo Rluc con cantidades crecientes de el cDNA para la construcción YFP (Figura 22B). El BRET neto máximo obtenido fue de 139,50 y el BRET<sub>50</sub> alcanzado fue de 21,25. Como control negativo se co-transfectaron cantidades constantes de CRH-R<sub>2</sub>-Rluc con cantidades crecientes del constructo GABA<sub>2b</sub>-YFP, en estos experimento se obtuvo un línea recta (Figura 22B), lo que nos indica que no hay transferencia especifica de energía, por lo que no hay BRET: Estos resultados indican que la señal de BRET obtenida utilizando CRH-R<sub>2</sub>-Rluc/DA-D<sub>1</sub>-YFP fue específica debido a la heteromerización de los receptores  $CRH-R_2/DA-D_1$ .

Para confirmar la interacción entre estos receptores también realizamos experimentos en células HEK293 vivas, la que se co-transfectaron con cantidades constantes del constructo DA-D<sub>1</sub>-Rluc y cantidades crecientes del constructo CRH-R<sub>2</sub>-YFP. Después de la transfección, la expresión de receptores

se observó tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma de las células (Figura 23A), siguiendo el mismo patrón descrito en el experimento anterior. Nuestros resultados de BRET muestran una curva hiperbólica también para el par DA-D<sub>1</sub>-Rluc/CRH-R<sub>2</sub>-YFP, cuando se co-transfectaron cantidades constantes del cDNA para el constructo Rluc con cantidades crecientes del cDNA para la construcción YFP (Figura 23B). El BRET neto máximo obtenido fue de 148,50 y el BRET<sub>50</sub> alcanzado fue de 77,12. Como control negativo se co-transfectaron cantidades constantes del constructo GABA<sub>2b</sub>-YFP, la curva lineal (Figura 23B), lo que nos indica que no hay transferencia específica de energía, por lo que no hay BRET: Estos resultados indican que la señal de BRET obtenida utilizando DA-D<sub>1</sub>-Rluc/CRH-R<sub>2</sub>-YFP fue específica debido a la heteromerización de los receptores CRH-R<sub>2</sub>/DA-D<sub>1</sub>.

Por otra parte, para corroborar que esta interacción está ocurriendo y no es efecto de la colisión de los receptores en el retículo, se realizaron experimentos de FRET/FRAP, que además nos permiten calcular la eficiencia de la interacción. Para esto utilizamos las construcciones CRH-R<sub>2</sub>-CFP y DA-D<sub>1</sub>-YFP, las cuales se co-transfectaron en células HEK293T. Después de la transfección, la expresión de los receptores se observó tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma de las células (Figura 24A). Para los experimentos de FRET/FRAP, se eligieron las células que presentan una distribución de receptores principalmente en la membrana. Cuando CRH-R<sub>2</sub>-CFP se excitó y ocurrió FRET la emisión del constructo CRH-R<sub>2</sub>-CFP disminuyó aumentando la emisión del

constructo DA- $D_1$ -YFP (Figura 24B), lo que nos indicó que existe una interacción específica entre estos receptores. Además, para medir la eficiencia de la transferencia de energía entre los receptores CRH-R<sub>2</sub>/ DA-D<sub>1</sub>, se utilizó la técnica de FRAP. En esta técnica a las células co-transfectadas se les realizó un photobleaching por 10 minutos, luego de ser cuantificado el FRET. Nuestros resultados muestran que la intensidad del constructo DA-D<sub>1</sub>-YFP disminuye en un 60%. incrementándose la intensidad del constructo CRH-R<sub>2</sub>-CFP, obteniéndose así una eficiencia de FRET (eFRET) de un 11% (Figura 24B). Todos estos datos muestran que existe una interacción física o molecular entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>. Por otra parte, nos preguntamos si esta interacción puede aumentar si activamos el receptor DA-D1, por esto realizamos experimentos preliminares de FRET/FRAP en donde evaluamos la eFRET en células HEK293T cotransfectadas con ambos receptores, en presencia 10µM del agonista selectivo para los receptores DA-D<sub>1</sub>, SKF83822, este fue agregado a las células 42 horas post-transfección, luego se realizaron los experimentos de FRET/FRAP, en estos resultados observamos que existe una tendencia a aumentar la eFRET (n=2) en las células expuestas al agonista SKF83822 (Figura 24C), observándose además que hay un aumento en la localización subcelular de los receptores CRH-R2, como ya lo habíamos descrito en puntos anteriores. 72 horas postransfección, se midieron las células expuestas al agonista 24 horas antes, se observa que al parecer se recupera eFRET.



**Figura 22.** Interacción de receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en células HEK293T. A) Distribución de receptores CRH-R<sub>2</sub>-Rluc (rojo) y DA-D<sub>1</sub>-YFP (verde) en células HEK293T. Para determinar los receptores CRH-R<sub>2</sub>-Rluc se realizó inmunofluorescencia (contra CRH-R<sub>2</sub>, 1:200 *anti-goat* N-20, Santa Cruz) Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal *Olympus Fluoview* 1000 con objetivo de 100x y **B)** Experimentos de BRET, se co-transfectaron las células con 1 µg de DNA CRH-R<sub>2</sub>-*Rluc* y cantidades crecientes de DNA de DA-D<sub>1</sub>-YFP. Como control se co-transfectaron CRH-R<sub>2</sub>-*Rluc* más GABA<sub>2b</sub>-YFP. Las muestras se leyeron en el equipo FLOUstar (BMG LABTECH). Las curvas se ajustaron utilizando una regresión no lineal y de una fase ecuación exponencial (hipérbola) Y=Bmax \* X/(Kd + X)).



**Figura 23.** Interacción de receptores DA-D<sub>1 y</sub> CRH-R<sub>2</sub> en células HEK293T. A) Distribución de receptores DA-D<sub>1</sub>-*Rluc* (rojo) y CRH-R<sub>2</sub>-YFP (verde) en células HEK293T. Para determinar los receptores DA-D<sub>1</sub>-*Rluc* se realizó inmunofluorescencia (contra DA-D<sub>1</sub>, 1:200 *anti-rabbit*, Santa Cruz) Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal *Olympus Fluoview* 1000 con objetivo de 100x y **B**) Experimentos de BRET, se co-transfectaron células con 1 µg de DNA DA-D<sub>1</sub>-Rluc y cantidades crecientes de DNA CRH-R<sub>2</sub>-YFP. Como control se co-transfectaron DA-D<sub>1</sub>-*Rluc* más GABA<sub>2b</sub>-YFP. Las muestras se leyeron en el equipo FLOUstar (BMG LABTECH). Las curvas se ajustaron utilizando una regresión no lineal y de una fase ecuación exponencial (hipérbola) Y=Bmax \* X/(Kd + X)).



**Figura 24.** Eficiencia de la interacción entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en células HEK293T. A) Distribución de receptores CRH-R<sub>2</sub>-CFP y DA-D<sub>1</sub>-YFP en células HEK293T. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal *Olympus Fluoview* 1000 con objetivo de 100x y en **B**) Experimentos de FRET/FRAP, primero se seleccionaron las células que expresan ambas construcciones, luego se excitó CRH-R<sub>2</sub>-CFP (433nm), las mediciones se grabaron en tiempo y las señales detectadas de FRET se digitalizaron con un conversor AD (Digidata1322A, Axon Instruments, Union City, CA) y se almacenaron en el software de Clampex 9.0 (Axon Instruments). Las mismas células se expusieron a *photobleaching* DA-D<sub>1</sub>-YFP (510nm por 10 min) y **C**) Eficiencia de FRET en presencia del agonista selectivo para receptores DA-D1 SKF. Los datos se obtuvieron de ambas grabaciones, se calculó la eficiencia de FRET (eFRET) y se graficó utilizando el software GraphPad Prism.

### 4. DISCUSION

Nuestros resultados nos indican que existe una interacción funcional entre los receptores de CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en el VTA de rata, dicha interacción se observa en una sensibilización en la liberación de glutamato en el VTA sólo en ratas que han sido tratadas con cocaína. Con nuestros experimentos de microdiálisis in vivo, primero observamos que se produce una sensibilización en la liberación de glutamato en el VTA, sólo de las ratas tratadas con cocaína, cuando se activan de manera independiente los receptores de DA-D<sub>1</sub> o los receptores de CRH-R<sub>2</sub>. Estos datos complementan lo descrito por Kalivas y Duffy (1998), en donde también utilizando microdiálisis mostraron que la activación de los receptores DA-D<sub>1</sub> facilita la liberación de glutamato en el VTA de ratas tratadas con cocaína. Por otra parte, Wang y cols, (2005 y 2007) describieron un aumento en los niveles extracelulares de glutamato, sólo de las ratas expuesta a cocaína, las cuales han sido sometidas a un estimulo estresante. Este estímulo activa a los receptores CRH-R<sub>2</sub>, quienes serían los responsables de dicha sensibilización de la liberación de glutamato en el VTA de rata. Estos datos no confirman la interacción funcional entre los receptores, para determinar esto, nosotros realizamos los mismo experimentos, pero en presencia de antagonistas selectivos de dichos receptores, en donde observamos que el antagonista de los receptores DA-D<sub>1</sub> inhibe la sensibilización en la liberación de glutamato inducida por la activación de los receptores CRH-R<sub>2</sub> del VTA de rata, sólo de aquella tratadas con cocaína, sin afectar la liberación de glutamato en ratas controles. Lo mismo se observó cuando en los experimentos realizados se utilizó el antagonista selectivo para receptores CRH-R<sub>2</sub>, este bloqueó la sensibilización de la

liberación de glutamato en el VTA de ratas tratadas con cocaína, e inducida por la activación de los receptores DA-D<sub>1</sub>,

Por otra parte, la activación simultánea de los receptores DA-D<sub>1</sub> y CRH-R<sub>2</sub>, muestra que existe una potenciación en la sensibilización de la liberación de glutamato en el VTA, sólo de las ratas tratadas con cocaína. Este efecto es bloqueado al realizar los experimentos en presencia de uno u otro de los antagonistas, lo que sugiere que puede existir un sinergismo entre las vías de señalización de dichos receptores o bien que la formación del complejo heteromérico produce un cambio en la cascada de señalización.

Por otra parte, nos pareció que tanto desde el punto de vista neuroquímico como neuroanatómico, es importante determinar la localización de los receptores y dilucidar si esta estaría involucrada directamente en sensibilización en la liberación de glutamato en el VTA. Para determinar esto, realizamos la preparación de sinaptosomas del VTA de las ratas controles y ratas tratadas con cocaína. El término *sinaptosomas* hace referencia a botones presinápticos obtenidos tras el resellado espontáneo de la membrana plasmática durante la homogeneización del tejido cerebral. El protocolo utilizado por nosotros para la preparación de sinaptosomas del VTA incluye modificaciones para disminuir la cantidad de densidades postsináptica (modificado de Araya y cols., 2007) a menos de un 3%, según lo descrito por Rodrígues y cols (2005), permitiendo el análisis de colocalización de receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en el presináptico. Con experimentos de IF en sinaptosomas del VTA de rata, observamos que existe un 60,7 % de terminales de origen glutamatérgicos, estos datos son consistentes con lo

observado con otras metodologías neuroanatómicas (Geisler y cols., 2007). De este porcentaje obtenido y gracias a la existencia de los marcadores de terminales glutamatérgicos de origen cortical (vGluT1) y subcortical (vGluT2), observamos que el 68,4% de los terminales glutamatérgicos son de origen subcortical, consistente nuevamente por lo descrito por Geisler y cols (2007), en donde se señala que los terminales glutamatérgicos en el VTA provienen fundamentalmente de numerosos núcleos subcorticales. Posteriormente, realizamos experimentos de doble y triple IF para determinar la localización en los terminales glutamatérgicos de los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>; estos resultados muestran que existe un 34,1% de la población de terminales glutamatérgicos de origen subcortical que poseen ambos receptores. Estos datos, sumado a la información obtenida en nuestros experimentos de microdiálisis, nos sugiere que la presencia de los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en los mismos terminales glutamatérgicos, estaría formando un complejo heteromérico responsable de producir la sensibilización en la liberación de glutamato en el VTA de ratas tratadas con cocaína. En los siguientes experimentos logramos determinar la existencia de este complejo heteromérico entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>, en los sinaptosomas de VTA y en células HEK293T, en las cuales se sobreexpresaron ambos receptores.

Desde el punto de vista de la interacción molecular entre receptores GPCRs, se ha descrito que los receptores de DA-D<sub>1</sub> forman homo y heterómeros con otros receptores de DA (Hasbi y cols., 2010), así como con otros receptores (Ciruela y cols., 2012). DA y CRH, han sido ampliamente involucrados en diversas zonas del cerebro, en patologías como la adicción a drogas de abuso y la recaída a drogas de

abuso (Corominas y cols., 2010; George y cols., 2012), pero no han sido reportados datos que indiquen que los receptores a CRH y DA interactúen formando un complejo heteromérico. Nuestros experimentos de BRET, indican que los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> tiene la capacidad de heteromerizar cuando se les coexpresa en células HEK293T, y que esta heteromerización modifica la localización subcelular de ambos receptores. Este cambio en la localización subcelular de los receptores se debe a la co-expresión de ellos, sin ser afectada por los distintos constructos utilizados en esta tesis. Para corroborar esto, analizamos la distribución subcelular de ambos receptores, en este trabajo observamos que los receptores DA-D<sub>1</sub> se localizan fundamentalmente en la membrana plasmática y los receptores CRH-R<sub>2</sub> están distribuidos en su mayoría intracelularmente (Fuenzalida, 2012). Esta observación es interesante, ya que hay otros casos en los que los receptores están constitutivamente intracelulares tales como los receptores cannabinoide tipo 1 (CB<sub>1</sub>) (Anderson y cols., 2003), 5-HT<sub>2A/C</sub> (Magalhes y cols., 2010), GABA<sub>1B</sub> (Margeta-Mitrovic y cols., 2000), entre otros, los cuales también pueden formar complejos heteroméricos. Cabe señalar que en la literatura se ha descrito que la isoforma β del receptor CRH-R<sub>2</sub> está presente en la superficie celular (Markovic y cols., 2008), esto difiere con lo que nosotros observamos con la isoforma α. Esta diferencia observada podría explicarse, debido a que las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor CRH-R<sub>2</sub> difieren en su secuencia N-terminal (Grigoriadis y cols., 1996). Schulz y cols (2010) han demostrado que el receptor CRH-R<sub>2a</sub> de rata tiene un péptido señal que afecta la expresión y el tráfico celular del receptor mostrándose una baja presencia de este receptor en la superficie celular.

Por otra parte, para corroborar que es una interacción directa entre los receptores, es decir, que se debe a una transferencia de energía y no a una colisión de los receptores en el interior de la célula, realizamos los experimentos de FRET/FRAP, que no sólo nos permitieron corroborar la interacción, sino que además nos permitió calcular la eficiencia de esta interacción.

Respecto a la formación de un complejo heteromérico *in vivo*, específicamente en el VTA de rata, nuestros experimentos de *western blot* no muestran diferencias significativas en la cantidad de receptores CRH-R<sub>2</sub> ni DA-D<sub>1</sub>, presentes en sinaptosomas del VTA de ratas controles versus ratas tratadas con cocaína. Al realizar los experimentos de co-inmunoprecipitación en sinaptosomas de VTA de ratas controles y ratas tratadas con cocaína, observamos que existe la formación de un complejo entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>, mostrando un claro aumento en el caso de las ratas tratadas con cocaína. Esto sugiere que la administración repetida de cocaína induce una alta tasa de formación del complejo heteromérico entre estos receptores, el cual podría deberse a un aumento en el tráfico de los receptores. He y cols (2009) mostraron que en células de neuroblastoma en cultivo los receptores DA-D<sub>1</sub> tienen una respuesta diferente a los del subtipo DA-D<sub>5</sub> en el tráfico el cual está determinado por la acción de agonistas, como lo es la DA. La activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA de rata inducida por la dosis repetida de cocaína, induce la liberación de DA desde terminales axónicos distales y de las regiones somatodendríticas de las neuronas dopaminérgicas en el mismo VTA. Este aumento de los niveles de DA sumado a los resultados e información recopilada, nos llevó a proponer una segunda hipótesis con respecto a la formación y tráfico del complejo heteromérico entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>. Propusimos que se produce un aumento en el reciclaje del receptor DA-D<sub>1</sub>, inducido por la administración de cocaína, y que dicho aumento transloca al receptor CRH-R<sub>2</sub> a la superficie celular, debido a que se forma un complejo heteromérico entre ambos receptores. Para resolver esta hipótesis se realizaron experimentos en donde se entrecruzaron las proteínas de membrana en sinaptosomas del VTA de ratas controles y de ratas tratadas con cocaína. Estos resultados muestran que sólo existe la presencia detectable de receptores CRH-R<sub>2</sub> en la membrana de los sinaptosomas de ratas tratadas con cocaína. Para complementar y dilucidar el tráfico de este complejo heteromérico se realizaron experimentos en células HEK293T, en donde se utilizó el paradigma experimental diseñado por O'Dowd y cols (2005), el cual permite estudiar la formación de homo y heterómeros estables. En estos resultados se mostró que el heterómero formado por los receptores CRH- $R_2$  y DA-D<sub>1</sub> es estable (Galaz, 2012), y que al realizar los experimentos con el constructo descrito por O'Dowd y cols (2005), en donde al receptor DA-D<sub>1</sub> se le agregó una secuencia de destinación nuclear (NLS), nos permitió no sólo complementar los datos sobre la interacción entre estos receptores en células HEK293T, sino que también nos ha permitido documentar que en condiciones basales el receptor DA-D<sub>1</sub>-NLS y CRH-R<sub>2</sub>, se encuentran principalmente intracelular, pero la presencia de SCH23990, un antagonista selectivo de los receptores DA-D<sub>1</sub>, estabiliza a los receptores DA-D<sub>1</sub>-NLS en la membrana plasmática, aumentando la presencia de los receptores CRH-R<sub>2</sub> en la superficie celular (Galaz, 2012). Estos resultados evidencian que la formación del complejo

heteromérico entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>, modifica la localización subcelular de ambos receptores, promoviendo el tráfico del receptor CRH-R<sub>2</sub> a la membrana plasmática, como ha sido demostrado para otros complejos heteroméricos de receptores GPCRs como el caso del receptor GABA<sub>1B</sub>, el cual es indispensable para la formación del heterómero GABA<sub>1B</sub>/GABA<sub>2B</sub> y su tráfico a la superficie celular (Kaupmann y cols., 1998 y Margenta-Mitrovic y cols., 2000). Adicionalmente, se sabe que la formación de heterómeros es de gran importancia para mejorar el tráfico a la superficie celular, es el caso de la interacción entre los receptores DA-D<sub>1</sub> y  $\mu$ -opioides (Juzasz y cols., 2008), los receptores DA-D<sub>1</sub> y DA-D<sub>2</sub>, donde se observa que a medida que aumenta la presencia de DA-D<sub>2</sub> y disminuye la de DA-D<sub>1</sub> en la superficie de la célula (So y cols., 2005), de manera similar a lo que hemos observado en nuestro heterómero formado entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub>.

Toda esta información sugiere fuertemente que el tráfico de los receptores CRH-R<sub>2</sub> a la superficie celular depende de su interacción molecular con los receptores DA-D<sub>1</sub>. Interesantemente, se ha descrito que la formación de heterómeros como la que ocurre entre los receptores DA-D<sub>1</sub> y DA-D<sub>2</sub>, induce además cambios en las cascadas de señalización, produciendo un aumento en la movilización de calcio intracelular (Reashib y cols., 2007 y Hasbi y cols., 2010), lo que probablemente induce como consecuencia cambios en las respuestas celulares. Será de gran importancia evaluar la cascada de señalización de nuestro heterómero, ya que no sólo hay interacción a nivel molecular, sino que además mediante microdiálisis observamos una interacción funcional de este complejo heteromérico entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> sólo en el VTA de ratas tratadas con cocaína.

Finalmente, es interesante pensar que este complejo heteromérico formado entre los receptores CRH-R2 y DA-D1, podría no ser sólo un caso particular del VTA de rata que ha sido expuesta previamente a cocaína, sino que podría estar presente en otros núcleos del cerebro de rata, tales como la amígdala y el lecho de la estría terminal, donde estos dos receptores podrían ser co-expresados en las mismas neuronas y/o terminales sinápticos (Corominas y cols., 2010), produciendo interesantes cambios en conductas de adicción a drogas de abuso y/o estrés. Por otra parte, nos parece tentador sugerir que este heterómero sería el responsable de modificar el efecto de CRH, de una inhibición a una potenciación de la transmisión glutamatérgica en la vía desde la amígdala basolateral a la corteza prefrontal medial en ratas tratadas repetidamente con cocaína (Orozco-Cabal y cols., 2008).

## 5. CONCLUSIONES

- 5.1. Existe una interacción molecular entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> sobreexpresados en células HEK293T.
- 5.2. Existe una interacción funcional y molecular entre los receptores CRH-R<sub>2</sub> y DA-D<sub>1</sub> en el VTA de ratas, con un aumento significativo en el VTA de ratas tratadas con cocaína.
- 5.3. La interacción ocurre en terminales glutamatérgicos de origen subcortical del VTA de ratas tratadas con cocaína.
- 5.4. Los datos sugieren que la sobre activación del receptor DA-D<sub>1</sub> inducida por el tratamiento repetido de cocaína, produce la localización en la membrana del receptor CRH-R<sub>2</sub>. Esto explicaría la sensibilización de la liberación de glutamato en el VTA de ratas tratadas con cocaína.

### 6. REFERENCIAS

- Ambre J, Ruo TI, Nelson J and Belknap S. Urinary excretion of cocaine, benzoylecgonine, and ecgonine methyl ester in humans. *J Anal Toxicol 1988, 12(6): 301-6.*
- Anderson SM, Bari AA and Pierce RC. Administration of the D<sub>1</sub>-like dopamine receptor antagonist SCH-23390 into the medial nucleus accumbens shell attenuates cocaine priming-induced reinstatement of drug-seeking behavior in rats. *Psychopharm (Berl) 2003;168(1-2):132-8.*
- Andersson H, D'Antona AM, Kendall DA, Von Heijne G and Chin CN. Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1: impact of a long N-terminal tail. *Mol Pharmacol 2003;* 64, 570-577.
- Andrés ME, Forray MI, Barría CG, Gysling K. Studies of cholecystokinin in the rat bed nucleus of stria terminalis. *Biochem pharmacol* 1993; 45 (11): 2283-8.
- **Araya KA, Pessoa Mahana C and González LG.** Role of cannabinoid CB1 receptors and Gi/o protein activation in the modulation of synaptosomal Na+,K+-ATPase activity by WIN55,212-2 and delta(9)-THC. *Eur J Pharmacol 2007; 572(1):32-9.*
- Caine SB, Thomsen M, Gabriel KI, Berkowitz JS, Gold LH, Koob GF, Tonegawa S, Zhang J and Xu M. Lack of self-administration of cocaine in dopamine D<sub>1</sub> receptor knock-out mice. J Neurosci 2007; 27(48):13140-50.
- **Carr DB and Sesack SR.** GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse 2000; 38(2):114-23.*

- Ciruela F, Ferré S, Casadó V, Cortés A, Cunha RA, Lluis C and Franco R. Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. *Cell Mol Life Sci 2006; 63(21):2427-31.*
- Ciruela F, Casado V, Rodrigues RJ, Lujan R, Burgueno J, Canals M, Borycz J,
  Rebola N, Goldberg SR, Mallol J, Cortes A, Canela El, Lopez-Gimenez JF,
  Milligan G, Lluis C, Cunha RA, Ferre S and Franco R. Presynaptic Control of
  Striatal Glutamatergic Neurotransmission by Adenosine A<sub>1</sub>–A<sub>2A</sub> Receptor
  Heteromers. *J Neurosci 2006; 26(7):2080-7.*
- Ciruela F, Fernandez-Duenas V, Llorente J, Borroto-Escuela D, Cuffi ML, Carbonell L, Sanchez S, Agnati LF, Fuxe K and Tasca CI. G protein-coupled receptor oligomerization and brain integration: focus on adenosinergic transmission. *Brain Res 2012; 1476, 86-95.*
- **Cornish JL and Kalivas PW.** Repeated cocaine administration into the rat ventral tegmental area produces behavioral sensitization to a systemic cocaine challenge. *Behav Brain Res. 2001; 126(1-2):205-9.*
- **Corominas M, Roncero C and Casas M**.Corticotropin releasing factor and neuroplasticity in cocaine addiction. *Life Sci 2010; 86: 1-9.*
- **Forray MI, Bustos G and Gysling K.** Noradrenaline inhibits glutamate release in the rat bed nucleus of the stria terminalis: in vivo microdialysis studies.*J Neurosci Res. 1999; 55(3):311-20.*

- **Forray MI and Gysling, K**. Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res. Brain Res. Rev. 2004; 47, 145-160.*
- **Fuenzalida J.** Estudio de la interacción molecular y funcional entre los receptores dopaminérgicos D1 y de la hormona liberadora de corticotrofina tipo-2. *Tesis para optar al título de bioquímica 2012.*
- Galaz P. Hetormerizacion de los receptores dopaminergicos D1 y de la hormona liberadora de corticotrpfina tipo 2 evidenciada mediante colocalizacion subcelular. *Tesis para optar al título de bioquímica 2012.*
- Geisler S, Derst C, Veh RW and Zahm DS. Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci.* 2007; 27(21):5730-43.
- **George SR, O'Dowd BF and Lee SP.** G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov 2002; 1, 808-820.*
- **Georges F** and **Aston-Jones G**. Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci. 2002; 22(12):5173-87.*
- Grigoriadis DE, Lovenberg TW, Chalmers DT, Liaw C and De Souze EB. Characterization of corticotropin-releasing factor receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci 1996; 780, 60-80.*
- Hague C, Chen Z, Pupo AS, Schulte NA, Toews ML and Minneman KP. The N terminus of the human alpha1D-adrenergic receptor prevents cell surface expression. *J Pharmacol Exp Ther 2004; 309, 388-397.*

- Hasbi A, O'Dowd BF and George SR. Heteromerization of dopamine D2 receptors with dopamine D1 or D5 receptors generates intracellular calcium signaling by different mechanisms. *Curr Opin Pharmacol 2010; 10, 93-99.*
- **He Y, Yu LP and Jin GZ.** Differential distributions and trafficking properties of dopamine D1 and D5 receptors in nerve cells. *Neurosci Bull. 2009; 25(2):43-53.*
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B and El Mestikawy S. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. J. Neurosci. 2001; 21, RC181.
- **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):27-78.*
- Juhasz JR, Hasbi A, Rashid AJ, So CH, George SR and O'Dowd BF. Mu-opioid receptor heteroligomer formation with the dopamine D1 receptor as directly visualized in living cells. *Eur J Pharmacol 2008; 581, 235-243.*
- **Kalivas PW, Churchill L and Klitenick MA.** GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neurosci. 1993; 57(4):1047-60.*
- **Kalivas PW and Duffy P.** D<sub>1</sub> receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *J Neurosci.* 1995; 15(7 Pt 2):5379-88.
- **Kalivas PW and Duffy P.** Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area. *J Neurochem.* 1998; 70(4):1497-502.

- **Kalivas PW and O'Brien C.** Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33(1):166-80.
- **Kauer JA and Malenka RC**. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8(11):844-58.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A and Bettler B. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature 1998: 396, 683-687.*
- Kuhar MJ, Sanchez-Roa PM, Wong DF, Dannals RF, Grigoriadis DE, Lew R and Milberger M. Dopamine transporter: biochemistry, pharmacology and imaging. *Eur Neurol.* 1990; 30 Suppl 1:15-20.
- Lammel S, Hetzel A, Hackel O, Jones I, Liss B and Roeper J. Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron 2008, 57:760-773.*
- **Lindroth P and MopperK.** High performance liquid chromatographic determination of subpicomol amounts af amino acids by precolumn fluorescente derivatization whith o-phthaldialdehyde. *Analytical Chem.* 1979 (51): 1667.
- Liu J, Yu B, Orozco-Cabal L, Grigoriadis DE, Rivier J, Vale WW, Shinnick-Gallagher P and Gallagher JP. Chronic cocaine administration switches corticotropin-releasing factor2 receptor-mediated depression to facilitation of glutamatergic transmission in the lateral septum. *J Neurosci.* 2005;25(3):577-83.
- Mantsch JR, Vranjkovic O, Twining RC, Gasser PJ, McReynolds JR, Blacktop JM. Neurobiological mechanisms that contribute to stress-related cocaine use. *Neuropharmacology 2013*
- McFarland K, Davidge SB, Lapish CC and Kalivas PW. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci.* 2004; 24(7):1551-60.
- Magalhaes AC, Holmes K D, Dale LB, Comps-Agrar L, Lee D, Yadav PN, Drysdale
  L, Poulter MO, Roth BL, Pin JP, Anisman H and Ferguson SS. CRF receptor
  1 regulates anxiety behavior via sensitization of 5-HT2 receptor signaling. *Nat Neurosci 2010; 13, 622-629.*
- **Maggio R, Innamorati G, Parenti M.** G protein-coupled receptor oligomerization provides the framework for signal discrimination. *J Neurochem.* 2007; 103(5):1741-52.
- **Margeta-Mitrovic M, Jan YN and Jan LY.** A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron 2000; 27, 97-106.*
- Margolis EB, Lock H, Hjelmstad GO and Fields HL. The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons?. *J Physiol.* 2006;577(*Pt* 3):907-24.
- **Markovic D, Punn A, Lehnert H and Grammatopoulos DK.** Intracellular mechanisms regulating corticotropin-releasing hormone receptor-2beta endocytosis and interaction with extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Endocrinol 2008; 22, 689-706.*

- **Nagy A** and **Delgado-Escueta AV**. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). *J Neurochem*. 1984;43(4):1114-23.
- O'Dowd BF, Ji X, Alijaniaram M, Rajaram RD, Kong MM, Rashid A, Nguyen T and George SR. Dopamine receptor oligomerization visualized in living cells. *J Biol Chem 2005; 280, 37225-37235.*
- **Olds J and Milner P.** Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*. *1954*;47(6):419-27.
- **Omelchenko N** and **Sesack SR**.Glutamate synaptic inputs to ventral tegmental area neurons in the rat derive primarily from subcortical sources. *Neurosci.* 2007; 146(3):1259-74.
- **Orozco-Cabal L, Liu J, Pollandt S, Schmidt K, Shinnick-Gallagher P and Gallagher JP**. Dopamine and corticotropin-releasing factor synergistically alter basolateral amygdala-to-medial prefrontal cortex synaptic transmission: functional switch after chronic cocaine administration.*J Neurosci. 2008; 28(2):529-42.*
- **Paxinos G and Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Acadamic 1986.
- Pierce RC and Kumaresan V. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse?. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006; 30(2):215-38.
- Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF and George SR. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology

are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104, 654-659.

- **Rodrigues RJ, Alfaro TM, Rebola N, Oliveira CR and Cunha RA**. Co-localization and functional interaction between adenosine A(<sub>2A</sub>) and metabotropic group 5 receptors in glutamatergic nerve terminals of the rat striatum. *J Neurochem 2005; 92(3):433-41.*
- **Rothman RB and Baumann MH.** Monoamine transporters and psychostimulant drugs. a review. *Eur J Pharmacol 2003; 479(1-3):23-40.*
- Saal D, Dong Y, Bonci A and Malenka RC. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron 2003; 37(4):577-82. Erratum in: Neuron 2003; 38(2):359.*
- Sitte HH and Freissmuth M. The reverse operation of Na(+)/Cl(-)-coupled neurotransmitter transporters--why amphetamines take two to tango. *J Neurochem 2010, 112:340-355.*
- So CH, Varghese G, Curley KJ, Kong MM, Alijaniaram M, Ji X, Nguyen T, O'Dowd BF and George SR. D1 and D2 dopamine receptors form heterooligomers and cointernalize after selective activation of either receptor. *Mol Pharmacol 2005; 68, 568-578.*
- **Sotomayor R, Forray MI and Gysling K.** Acute morphine administration increases extracellular DA levels in the rat lateral septum by decreasing the GABAergic inhibitory tone in the ventral tegmental area. *J Neurosci Res. 2005; 81(1):132-9.*

- Schulz K, Rutz C, Westendorf C, Ridelis I, Vogelbein S, Furkert J, Schmidt A, Wiesner B and Schulein R. The pseudo signal peptide of the corticotropinreleasing factor receptor type 2a decreases receptor expression and prevents Gimediated inhibition of adenylyl cyclase activity. J Biol Chem 2010; 285, 32878-32887.
- **Tzschentke TM.** Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol. 2007; 12(3-4): 227-462.*
- **Ungless MA, Singh V, Crowder TL, Yaka R, Ron D and Bonci A.** Corticotropinreleasing factor requires CRF binding protein to potentiate NMDA receptors via CRF receptor 2 in dopamine neurons. *Neuron 2003; 39, 401-407.*
- Wang B, Shaham Y, Zitzman D, Azari S, Wise R and You Z.B. Cocaine Experience Establishes Control of Midbrain Glutamate and Dopamine by Corticotropin-Releasing Factor: A Role in Stress-Induced Relapse to Drug Seeking. *J Neurosci; 25(22): 5389-96.*
- **Wang B**, **You ZB**, **Rice KC** and **Wise RA**. Stress-induced relapse to cocaine seeking: roles for the CRF(2) receptor and CRF-binding protein in the ventral tegmental area of the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007; 193(2): 283-94.
- Yamaguchi T, Sheen W and Morales M. Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci.* 2007; 25(1):106-18.