128

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INTERACCION DE LOS SISTEMAS DOPAMINERGICOS Y NORADRENERGICOS EN EL N. Acc. DURANTE LA SENSIBILIZACION A LA ANFETAMINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

AMAYA MIQUELAJAUREGUI GRAF

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JULIO MORAN ANDRADE

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

296529

MEXICO, D. F. 2001

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

VERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Interacción de los sistemas Dopaminérgico y Noradrenérgico en el NAcc durante la sensibilización a la Anfetamina"

realizado por Amaya Miquelajauregui Graf

con número de cuenta 097536323 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis propietario	Dr. Julio Morán Andrade
Propietario	Dra. Lourdes Massieu Trigo
Propietario	Dra. Milagros Méndez Ubach
Suplente	Dr. Francisco Pellicer Graham
Suplente	Dr. Federico Bermudez Rattoni

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

La ciencia no tiene patria
Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo no hubiese sido posible sin la acertada y firme dirección, así como el invaluable estímulo y apoyo del Dr. Julio Morán Andrade y de la Dra. Laura Lambas-Señas, investigadores del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y de la Université Claude-Bernard Lyon 1, respectivamente.

Para ellos, mi más profundo reconocimiento.

A mis padres con todo mi amor y admiración, por haberme dedicado su vida y por haber forjado lo que ahora soy.

A mis queridos hermanos Yosune y Unai, con quienes he compartido las pequeñas y grandes cosas de la vida.

A todos mis primos, tíos y demás familiares, tanto presentes como ausentes.

A mi Aitona Angel y a mi Amona Teodora (q.e.p.d.), que con su lucha y esfuerzo me ofrecieron un importante ejemplo a seguir.

A mis queridos Tita y Abuelito, que siempre han alentado mis sueños y a quienes llevo en mi corazón.

A los centros docentes que me formaron y con los que siempre estaré en deuda: Colegio Madrid, Universidad Nacional Autónoma de México, McGill University y Université Claude-Bernard Lyon 1.

Un especial agradecimiento a las siguientes instituciones que me han apoyado a lo largo de mi vida y en diferentes etapas: Fundación Alberto y Dolores Andrade, Secretaría de Educación Pública, Universidad Nacional Autónoma de México (PROBETEL), Fundación Telmex, Fundación Chrysler, Luz y Fuerza del Centro y Museo del Niño.

Indice

RESUMEN 1

INTRODUCCION 2

ANTECEDENTES 3

I Sensibilización conductual a los psicoestimulantes . 3

II Sistemas dopaminérgicos mesencefálicos . 4

1 Localización anatómica . 4

2 La vía de proyección mesoaccumbens y la respuesta a las drogas 4

III La anfetamina un potente psicoestimulante 5

1 Mecanismo de acción . . 5

2 Efectos conductuales y neuroquímicos 6

a) Administración aguda 6

b) Administración repetida 7

OBJETIVOS 8

MATERIAL Y METODOS 8

I Animales . . . 8

II Procedimiento experimental . . . 8

1 Microdiálisis intracerebral 10

a) Fabricación de sondas 10

b) Implantacion de la cánula guía . 11

c) Implantación de la sonda de microdiálisis . 11

d) Recolección de dialisados . 11

e) Verificacion histológica del sitio de implantacion 12

2 Análisis de dialisados 12

3 Actimetria . 13

III Agentes farmacologicos 13

IV Grupos experimentales . .. 14

V Expresion y análisis estadístico de resultados . 14

RESULTADOS 27
I. Respuesta conductual a un nuevo ambiente . . 27
II Respuesta conductual y neuroquímica a la anfetamina D8 vs D1 27
1 Estudio conductual . . .27
2. Estudio neuroquímico . . . 27
III Efecto de la prazosina en la respuesta conductual y neuroquímica inducida por la anfetamina 27
1 Estudio conductual 27
2 Estudio neuroquímico 27
IV Efecto de la prazosina en la respuesta conductual a la anfetamina a lo largo de la sensibilización estudio preliminar . . . 27
1 Administración de prazosina en D8 27
2 Administración de prazosina en D1 27
DISCUSION 27
CONCLUSIONES 27
REFERENCIAS 27

RESUMEN

La administración repetida de anfetamina induce en el animal el establecimiento de un fenómeno amado "sensibilización conductual" que se caracteriza, por una parte, por un aumento progresivo y urable de la respuesta motora inducida por el psicoestimulante y, por otro lado, por una ipersensibilidad persistente que se expresa en el momento de la reexposición a la droga o a una ondición de estrés.

La sensibilización conductual a la anfetamina es considerada como un modelo animal de psicosis ducida por fármacos y de adicción a drogas de abuso en el hombre. Las neuroadaptaciones que onlleva el fenómeno de sensibilización se han asociado principalmente a modificaciones del sistema opaminérgico mesocorticolímbico. Sin embargo, al administrar la anfetamina de manera aguda se han bservado también alteraciones en la transmisión noradrenérgica, siendo así posible la implicación de la oradrenalina en este fenómeno.

El objetivo de nuestro trabajo ha sido el de estudiar las posibles modificaciones en la transmisión opaminérgica y noradrenérgica en una estructura mesolímbica importante, el núcleo accumbens, a lo rgo de la sensibilización conductual a la anfetamina. Para ésto, utilizamos la técnica de microdiálisis tracerebral *in vivo* que permite seguir las variaciones de las concentraciones extracelulares de opamina (DA) y noradrenalina (NA) en el núcleo accumbens La utilización de animales en libre ovimiento nos permitió llevar a cabo, simultáneamente al estudio neuroquímico, un estudio nductual.

En un principio, validamos desde un punto de vista conductual un protocolo de sensibilización e consiste en dos inyecciones de anfetamina (1 mg/kg) separadas por un periodo de una semana osteriormente, utilizando dicho modelo confirmamos la existencia de modificaciones en las ncentraciones extracelulares de DA en el núcleo accumbens en respuesta a la anfetamina; asimismo, mostramos por primera vez la existencia de modificaciones en la concentración de NA en esta región l cerebro bajo estas condiciones. Finalmente, demostramos también que el efecto inhibidor de la azosina, un antagonista de los receptores adrenérgicos alfa-1, sobre la hiperactividad locomotora ducida por la anfetamina, puede estar asociado a las modificaciones de la transmisión tanto paminérgica como noradrenérgica en el núcleo accumbens.

estros resultados sugieren que las interacciones entre los sistemas dopaminérgico y noradrenergico en núcleo accumbens pueden participar en el efecto conductual inducido por la anfetamina.

estudio de dichas interacciones podria ser de utilidad en la comprensión de los mecanismos ponsables del proceso de sensibilización a los psicoestimulantes

INTRODUCCION

La administración repetida de psicoestimulantes induce en el animal el establecimiento de un nómeno durable denominado "sensibilización conductual" que se caracteriza por una parte, por un mento progresivo y durable de la respuesta motora inducida por el psicoestimulante. Por otra parte, urre también una hipersensibilidad persistente que se expresa en el momento de la reexposición a la oga. La sensibilización conductual a la anfetamina, fenómeno durante el cual probablemente se ablecen neuroadaptaciones de manera progresiva, es considerada como un modelo animal de psicosis lucida por fármacos y de adicción a drogas de abuso en el hombre (Robinson and Berridge, 1993 , eberman et al., 1997). Los protocolos experimentales utilizados con mayor frecuencia con el objeto de ucir una sensibilización conductual consisten en varias inyecciones repetidas de anfetamina seguidas un periodo de privación de duración variable (Pierce and Kalivas, 1997). De manera interesante, se ha nostrado recientemente que basta una sola exposición a la anfetamina para inducir una sensibilización nductual similar a aquella que se obtiene con el protocolo de inyecciones múltiples (Vanderschuren et 1999).

Debido a que uno de los blancos moleculares de la anfetamina es el transportador de la amina, las investigaciones sobre las bases neuroquímicas de la sensibilización conductual se han alizado en dicho neurotransmisor (Vanderschuren and Kalivas, 2000). Asimismo, se ha mostrado que istema dopaminérgico mesocorticolímbico, cuyos cuerpos celulares se localizan en el área tegmental tral y el cual se proyecta sobre el núcleo accumbens (Le Moal and Simon, 1991), juega un papel ve en el establecimiento de la sensibilización conductual a la anfetamina (para revisión, ver Pierce Kalivas, 1997).

Al igual que el transportador de la DA, el transportador de la noradrenalina (NA) es blanco de la etamina y de otros psicoestimulantes (Feldman el al., 1997). Algunos estudios recientes sugieren que NA tendría cierta implicación en la respuesta conductual inducida por los psicoestimulantes. Por nplo, se ha demostrado que la activación locomotora inducida por la anfetamina es mayor en ratones carecen del transportador de la NA (Xu et al., 2000) y que dicha activación se reduce al administrar osina, un antagonista de los receptores adrenérgicos alfa-1 (Darracq et al., 1998). Sin embargo, el el del sistema noradrenérgico en los mecanismos de la sensibilización conductual todavía no ha sido diado.

El núcleo accumbens, estructura clave en la expresion de la sensibilización conductual, podría ser tio de intervencion de la NA en el desarrollo de dicho fenómeno. Por una parte, el núcleo accumbens be una inervación noradrenérgica proveniente del bulbo (Berridge et al., 1997 ; Delfs et al., 1998). otro lado, ciertas observaciones farmacológicas permiten vislumbrar la existencia de interacciones

tre la NA y la DA en el núcleo accumbens. Así, el bloqueo del transportador de la NA por la sipramina provoca un aumento en la concentración extracelular de DA en el núcleo accumbens amamoto and Novotney, 1998). Además, la liberación de DA en el núcleo accumbens podría estar gulada por los receptores adrenérgicos alfa y beta (Tuinstra and Cools, 2000). Tomando en cuenta os elementos, podríamos considerar una posible participación de la noradrenalina en el desarrollo del nómeno de sensibilización a la anfetamina.

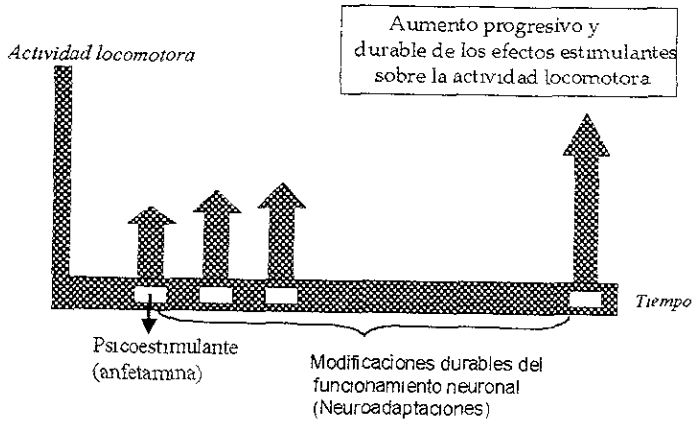
ANTECEDENTES

Sensibilización conductual a los psicoestimulantes

En el hombre, el consumo abusivo de sustancias psicoactivas puede generar una dependencia, la l podría ocurrir como resultado de la generación de mecanismos de adaptación neuroquímica a nivel ebral. En el animal, la administración repetida de psicoestimulantes, como la anfetamina, induce el ablecimiento de un fenómeno durable llamado sensibilización conductual (Robinson and ridge, 1993; Pierce and Kalivas, 1997). Dicho fenómeno, se traduce en un aumento progresivo de la puesta motora inducida por la administración del psicoestimulante, al igual que por la persistencia de hipersensibilidad conductual, la cual se manifiesta con la reexposición a la droga (Esquema 1) ha sensibilización conductual es considerada como un modelo animal útil para estudiar las bases roquímicas de la adicción (para revisión, ver Robinson and Berridge, 1993).

La aparición del fenómeno de sensibilización conductual implica la ocurrencia de modificaciones el funcionamiento neuronal, las cuales pueden ser de larga duración y en ocasiones llegar a ser nanentes. La hipótesis que se ha propuesto afirma que es la persistencia de dichas neuroadaptaciones ue provoca que los toxicómanos sean hipersensibles a las drogas y a los estímulos asociados a ellas, después de varios años de privación (Robinson and Berridge, 1993).

El estudio de las bases neuroquímicas subyacentes a la sensibilización se ha focalizado cipalmente en el sistema dopaminérgico. Actualmente existe un consenso sobre la importancia de la en la sensibilización conductual y en las propiedades reforzadoras de los psicoestimulantes, ablemente de la anfetamina (Feldman et al., 1997 ; Vanderschuren and Kalivas, 2000).



Esquema 1 : Modelo de sensibilización conductual

Sistemas dopaminérgicos mesencefálicos

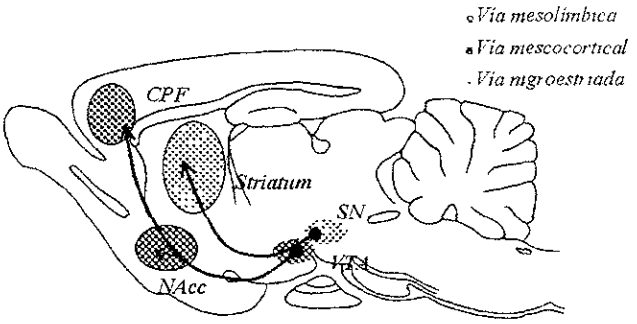
1. Localización anatómica

De acuerdo con la clasificación de Björklund et Lindvall (1984), la cual se basa primordialmente las áreas de proyección, las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo están divididas en tres vías : ssolímbica, mesocortical y nigroestriatal (Esquema 2)

De particular interés en nuestro estudio son las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica, vos cuerpos celulares se localizan a nivel del área tegmental ventral (VTA) Estas neuronas se oyectan principalmente sobre el núcleo accumbens (vía mesoaccumbens), pero también sobre el bérculo olfativo, el septum y los núcleos de la amígdala (Darracq, 1998 ; Barrot, 1998).

2. La vía de proyección mesoaccumbens y la respuesta a las drogas

La búsqueda del sustrato biológico de las adicciones ha puesto en evidencia la importancia de las ıronas dopaminérgicas del mesencéfalo y sus proyecciones hacia una de las regiones del complejo ıtal: el núcleo accumbens.



Esquema 2 : Representación de los sistemas dopaminérgicos del mesencéfalo

CPF: corteza prefrontal, Nacc: núcleo accumbens, SN: substancia negra, VTA: área tegmental ventral

Todas las drogas de uso abusivo, ya sean los psicoestimulantes, los opiáceos, el alcohol o la otina, tienen en común la capacidad de aumentar los niveles extracelulares de DA en el núcleo umbens (Di Chiara and Imperato, 1988 ; Vanderschuren and Kalivas, 2000).

Las conexiones neuronales del núcleo accumbens están íntimamente relacionadas con la eración de conductas adaptativas en respuesta a estímulos relevantes (Vanderschuren and ivas, 2000). Por esta razón, el núcleo accumbens es considerado como una interfase entre el sistema bico y el sistema motor. Específicamente, ciertos autores han definido dos subregiones dentro del leo accumbens ("core" et "shell"), distintas anatómica y funcionalmente (Pierce and Kalivas, 1997) emas, dichas subregiones no responden de igual manera a la administración aguda de oestimulantes (Pontieri et al., 1995) ni a lo largo de la sensibilización (Cadoni et al., 2000).

La anfetamina : un potente psicoestimulante

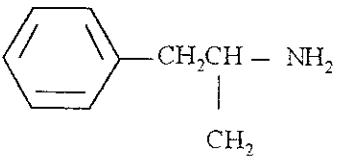
1. Mecanismo de acción

La anfetamina o α-metilfenetilamina (Esquema 3) es un derivado de la feniletilamina y es capaz atravesar la barrera hematoencefálica (Innes and Nickerson, 1975). El mecanismo de acción que levan los efectos centrales de la anfetamina comprende (Hoffman, 1992):

a) la liberación de catecolaminas de sus sitios de almacenamiento en las terminaciones neuronales.

b) la inhibición de la recaptura de catecolaminas

c) la inhibición de la monoaminoxidasa (a dosis altas, >10 mg/kg).



Esquema 3 : Estructura de la anfetamina

La anfetamina, a diferencia de otros inhibidores de la recaptura de catecolaminas que actúan lamente bloqueando al transportador, aparece también como sustrato del transportador. Así, el modelo « exchange-diffusion » postula que cuando la anfetamina presente en el medio extracelular es pturada por el transportador de la DA y conducida al interior de la neurona, el transportador funciona dirección opuesta al hacer que la DA salga al medio extracelular (para revisión, ver Feldman et al., 97).

Por otro lado, es importante hacer notar que la anfetamina es capaz de unirse también al nsportador de la noradrenalina, con la misma afinidad con la que se une al transportador de la DA mara and Kuhar, 1993).

2. Efectos conductuales y neuroquímicos

a) Administración aguda

La anfetamina, al igual que los otros psicoestimulantes, estimula la atención, acelera los procesos generación de ideas y agudiza las percepciones sensoriales. La anfetamina es uno de los coestimulantes más poderosos, especialmente bajo la forma de D-anfetamina que es de 3-7 veces más az que su isómero L-anfetamina (Hoffman, 1992 ; Darracq, 1998). En la rata, la actividad omotora es un parámetro comunmente utilizado para medir la activación inducida por la anfetamina ldman et al., 1997 ; Pierce and Kalivas, 1997).

La magnitud de la actividad locomotora inducida por la anfetamina depende de la dosis nistrada. A una dosis de 1 mg/kg, las ratas muestran el máximo de actividad motora; a dosis más

tas la anfetamina induce, además de la hiperactividad locomotora, la generación de conductas tereotipadas (Porrino et al., 1984).

Desde un punto de vista neuroquímico, la administración de anfetamina conlleva un aumento en concentración extracelular de DA, especialmente en el núcleo accumbens y en la corteza prefrontal e Moal and Simon, 1991 ; Di Chiara and Imperato, 1988; Hertel et al., 1996). La administración de fetamina provoca también un aumento de NA en la corteza prefrontal y en el hipocampo lorin et al., 1994 ; Kuczenski and Segal, 2001)

b) Administración repetida

En el hombre, el consumo repetido de anfetamina puede llevar a la generación de estados de siedad y de irritabilidad intensos, pudiendo llegar a manifestar síntomas psicóticos de tipo paranoide, nto con alucinaciones e interpretaciones delirantes de persecución. Por lo tanto, se piensa que su trema toxicidad se debe al abuso del psicoestimulante.

En el animal, una vez que la anfetamina ha sido administrada de manera repetida e intermitente, puede constatar la aparición de la sensibilización conductual; el grado de sensibilización estará en ción del periodo de privación de la droga (Paulson and Robinson, 1995).

De manera similar, la respuesta neuroquímica se ve modificada a lo largo de la sensibilización. administrar la anfetamina de manera repetida, la DA tiene una implicación importante tanto en el ablecimiento como en la expresión de este fenómeno (Vanderschuren and Kalivas, 2000). En el cleo accumbens, la liberación de DA inducida por la anfetamina se incrementa de manera significativa la interrupción del tratamiento es de alrededor de 14 días (Pierce and Kalivas 1997). Esta respuesta paminérgica sensibilizada puede explicarse, entre otros, por un aumento de la capacidad de las minaciones nerviosas para liberar DA, lo cual se ha puesto en evidencia *in vitro* usando cortes ebrales a nivel del núcleo accumbens. Asimismo, a lo largo de la sensibilización podrían ocurrir nbios en la eficacia del transportador de la DA (para revisión, ver Pierce and Kalivas 1997)

En el caso de la NA, un solo estudio realizado *in vivo* a nivel del hipocampo, muestra un mento significativo de la concentración basal de NA después de haber obtenido una sensibilización a nfetamina

Varios estudios han demostrado *in vivo* que la liberación de DA inducida por la anfetamina menta en el núcleo accumbens de ratas sensibilizadas en el momento de una reexposición a la etamina administrada sistémicamente (Paulson and Robinson, 1995). Sin embargo, la administración ecta de esta droga en el núcleo accumbens no induce una sensibilización conductual (Vanderschuren

nd Kalivas, 2000) Por el contrario, la inyección directa de anfetamina en el área tegmental ventral no nodifica la actividad locomotora pero induce, si se lleva a cabo de manera repetida, una sensibilización onductual que puede revelarse con la administración sistémica del psicoestimulante (Pierce and Kalivas, 1997). La implicación de diversas áreas cerebrales en el fenómeno de sensibilización a la nfetamina ha sido también puesta en evidencia en la corteza prefrontal. De hecho, se ha demostrado ue las lesiones en dicha estructura impiden el desarrollo del fenómeno de sensibilización Cador et al., 1999).

OBJETIVOS

De acuerdo a lo anteriormente expuesto los objetivos de nuestro trabajo serán:

Establecer un modelo experimental utilizando ratas en libre movimiento que permita estudiar la sensibilización a la anfetamina, tanto en el plano conductual como en el neuroquímico, evaluando simultáneamente la conducta motora de la rata y las concentraciones extracelulares de DA y NA.

Estudiar las modificaciones de las concentraciones extracelulares de DA y de NA en el núcleo accumbens a lo largo de la sensibilización conductual a la anfetamina.

Observar la influencia de la prazosina sobre las respuestas conductual y neuroquímica a la anfetamina

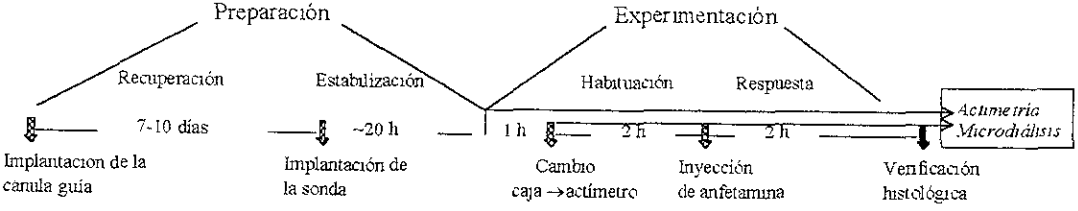
MATERIAL Y METODOS

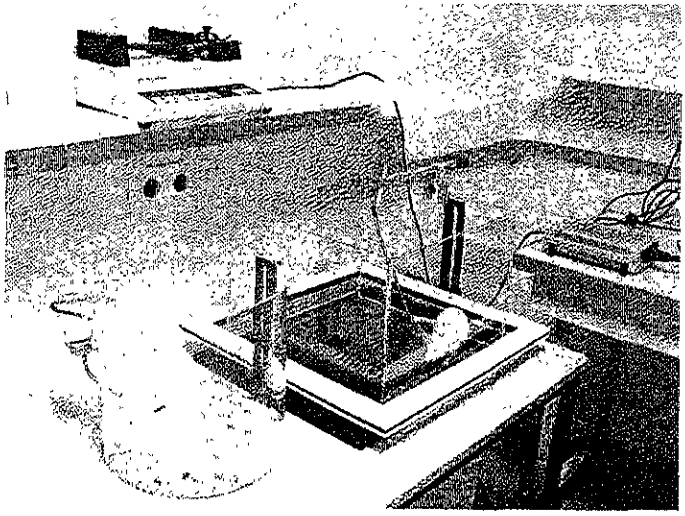
Animales

Todos los experimentos se realizaron en ratas macho Sprague-Dawley (Harlan, France) con un so de entre 300-350 g el día de la experimentación. Las ratas se alojaron en un bioterio climatizado a °C e iluminado con un ciclo de luz-obscuridad de 12h 12h (luz de 6h-18h). Las ratas fueron antenidas en dichas condiciones durante la semana previa a la manipulación, con acceso libre al agua y a comida.

Procedimiento experimental

El protocolo de base de nuestros experimentos se desarrolla en dos etapas: la preparación de los imales y la experimentación. Durante la experimentación, realizamos simultáneamente un estudio uroquímico por microdiálisis y un estudio conductual (medición de la actividad locomotora) por imetría (ver figura 1).





ura 1 : a) Representación esquemática del protocolo de base de nuestros experimentos

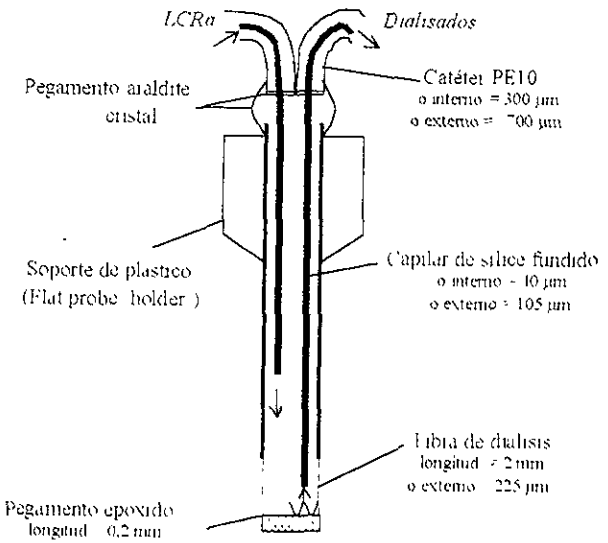
b) Fotografía que muestra el desarrollo de un experimento

1. Microdiálisis intracerebral

La microdiálisis intracerebral permite recuperar, *in vivo*, los compuestos endógenos presentes en medio extracelular cerebral gracias a la implantación estereotáxica de una sonda de microdiálisis que ntiene una parte dialisante semi-permeable. Dicha sonda es perfundida lentamente con liquido faloraquídeo artificial (LCRa); los dialisados que se obtienen son entonces analizados con el objeto de terminar la concentración de catecolaminas.

a) Fabricación de sondas

Las sondas utilizadas han sido elaboradas según una adaptación del modelo inicialmente descrito r Abercrombie y Finlay (1991). La parte dialisante de la sonda mide 2 mm de longitud y consiste en a fibra de diálisis de celulosa (Spectra/Por, umbral de detención molecular . 13000 Da, de 216 µm de xterno, Spectrum Medical Industries, USA). A continuación se muestra la representación esquemática una sonda :



Esquema 4 : Representación esquemática de una sonda de diálisis

b) Implantación de la cánula guía

Las ratas son anestesiadas con hidrato de cloral (400 mg/kg, inyección i.p. de 8 ml/kg) y olocadas en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, USA). Su temperatura corporal es antenida a 37°C con la ayuda de una manta termógena (Harvard Apparatus, USA). Se realiza una cisión sagital en la piel del cráneo y se limpia bien el hueso Con la ayuda de una fresa dentaria, se ace un pequeño orificio que permitirá la implantación de la cánula guía (Harvard Apparatus, USA). gún las coordenadas estereotáxicas para el del núcleo accumbens : anterior 1,8 mm, lateral 1,2 mm on relación al Bregma) ; profundidad 2 mm para la cánula guía y 7,5 mm para la sonda (con relación a superficie del hueso) (Paxinos and Watson, 1998). Una vez instalada la cánula, se anclan al cráneo es tornillos y el conjunto es fijado a la superficie expuesta del cráneo por medio de cemento dental dhesivo (Super Bond C&B, USA).

Después de la implantación de la cánula guía, las ratas se colocan nuevamente en el bioterio ntro de cajas cilíndricas hasta que se recuperen por completo de la operación (7 a 10 días).

c) Implantación de la sonda de microdiálisis

Previamente a la implantación, la sonda es perfundida con etanol 70% durante 15 minutos y con ua ultrapura durante una hora. La entrada y la salida de la sonda se conectan a dos capilares de sílice ndido (45 cm de longitud, 75 µm ø interno, 150 µm ø externo, Composite Metal Service, Ltd. UK) otegidos por un catéter de polietileno, y el conjunto es introducido dentro de un resorte Los dos pilares son atados a una cánula giratoria de dos vías (Instech laboratories, USA), lo que permite la olección de los dialisados al exterior de la caja de experimentación, dejando así al animal en libre ovimiento. La sonda es perfundida con LCR (NaCl 149 mM, KCl 2,8 mM, $MgCl_2$ 1,2 mM, $CaCl_2$ 2 mM, NaH_2PO_4 226 mM, Na_2HPO_4 222 mM, pH 7,4) a una velocidad constante de 1 µl/min.

La implantación de la sonda se realiza la víspera de la experiencia de microdiálisis, entre 15 h y h. En ausencia de anestesia, se retira el mandrín del interior de la cánula y se implanta la sonda en su gar. Enseguida, se coloca al animal en su caja habitual dentro del cuarto en donde se realiza la periencia de microdiálisis Esta pieza es climatizada e iluminada de la misma manera que el bioterio

d) Recolección de dialisados

La recolección de dialisados se efectúa el día siguiente a la implantación y comienza roximadamente a las 10 h. Los dialisados de 10 µl se recuperan cada 10 min. Inmediatamente despues cada recolección, 8 µl del dialisado se mezclan con 0,8 µl de una solución $3x10^{-}$ M de idroxibenzilamina (DHBA) en $HClO_4$ 0,117 M conteniendo ácido ascórbico 17,55 mM. Esto permite roducir en los dialisados un standard interno, la DHBA, indispensable para el analisis de

tecolaminas, y al mismo tiempo protegiéndolas de su oxidación. Los dialisados son congelados de mediato y se guardan a – 40°C para su análisis, el cual se realiza dentro de las 48 h siguientes.

e) Verificación histológica del sitio de implantación

Al final del experimento de microdiálisis, la rata es anestesiada con uretano (1,4 g/kg, yección i.p. de 1,5 ml/kg). Se lleva a cabo una perfusión con azul de metileno al 0,1% en LCRa rante 10 min a través de la sonda. La rata se sacrifica con uretano (1,4 g/kg, inyección i.p. de nl/kg) y su cerebro es extraído y congelado a – 40°C. Se realizan cortes frontales de 80 µm de espesor n la ayuda de un criostato y se tiñen con rojo neutro. Los cortes son observados al microscopio y el io de implantación puede verificarse gracias a la marca azul dejada por la sonda.

2 Análisis de dialisados

Los dialisados son analizados por electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida r láser (CE-LIFD) con el objeto de determinar las concentraciones de DA y NA, según el protocolo scrito por Bert et al (1996).

Principio de la técnica (CE-LIFD)

La electroforesis capilar puede ser definida como una técnica de separación electrocinética que se efectúa dentro de un capilar de diámetro interno inferior a 100 µm conteniendo medio electrolítico. La inyección de las muestras se realiza de una manera hidrodinámica que permite la inyección de volúmenes pequeños (del orden de nl). La separación de las moléculas se lleva a cabo al aplicar una tensión en los extremos del capilar. Así, las moléculas van a migrar al interior del capilar de acuerdo con los fenómenos de electromigración y electroósmosis.

La detección de los compuestos separados por la electroforesis se efectúa en nuestro caso por fluorescencia inducida por láser (LIF), método inicialmente descrito por Gassmann y colaboradores en 1985. Este tipo de detección se basa en la excitación de moléculas con un rayo láser y en la detección de la fluorescencia emitida. Con el fin de obtener una fluorescencia óptima, es necesario incorporar, mediante una reacción de derivación, un agente fluoróforo en las moléculas que nos interesan. En nuestro caso, el agente utilizado es el Naftaleno 2,3-dicarboxialdehido (NDA) el cual reacciona con las aminas primarias en presencia de cianuro de sodio para dar como resultado los derivados ciano[*f*]benzoisoindol (CBI) altamente fluorescentes a 442 nm. La fluorescencia puede ser entonces detectada por un fotomultiplicador: una corriente es generada y la fluorescencia relativa es expresada en µA

El día del análisis, las muestras son descongeladas. Con el fin de obtener los derivados luorescentes de catecolaminas, se agregan 2,4 µl de una solución que contiene 1,6 µl de una mezcla 1:5 e NaCN 87 mM y buffer borato 500 mM al igual que 0,8 µl de naftaleno dicarboxaldehido (NDA) ,925 mM. La inyección neumática de la muestra dentro del aparato (3 psi durante 10 seg) es seguida de na inyección de ácido fosfórico 0,2 M que facilita la preconcentración ("stacking") de la muestra y que umenta la sensibilidad de la detección.

La separación de moléculas se efectúa dentro de un capilar en sílice fundido (46 cm de longitud, 0 µm ø interno, Composite Metal Service Ldt, UK) al cual se le aplica una tensión de 25 kV. El análisis ene lugar en un buffer de fosfato 110 mM, pH 7,05. El análisis se realiza con un aparato P/ACE MDQ 'apillary Electrophoresis System (Beckman, USA) equipado con un detector de fluorescencia Picometrics, Zetalif, France) La excitación se produce con la ayuda de un láser Liconix (USA), Hélium-Cadmium (modelo 4200 PS, USA) emitiendo a 442 nm con una potencia de excitación de 5 mW La emisión de fluorescencia es recogida a 490 nm; ésta es detectada por un fotomultiplicador y xpresada en RFU Posteriormente, se miden la superficies de los picos correspondientes a la DA, a la A y a la DHBA (standard interno); las concentraciones de DA y NA son calculadas a partir de la recta regresión obtenida con el análisis de un blanco (LCRa) y dos standards (DA 10^{-8} M, NA 10^{-8} M ; DA 0^{-9} M, NA 10^{-9} M) sometidos al mismo tratamiento que los dialisados

3 Actimetría

La actimetría permite medir la actividad locomotora de la rata. Para ello, el animal se introduce entro de una caja transparente (40 cm x 40 cm x 30 cm) colocada al interior de un actímetro, que onsiste en un marco instalado a 5 cm del nivel de la base y el cual contiene 16 x 16 células de rayos frarojos (LE8811 Motor Activity Monitor, Letica). El número de cortes de rayos infrarojos producidos or el movimiento de la rata son grabados en la memoria de una unidad de control, la cual efectúa el alisis de la información con el fin de discriminar la actividad deambulatoria de la no-deambulatoria

l Agentes farmacológicos

Los agentes farmacologicos se administraron por vía subcutánea (s.c.) a nivel de la nuca a una sis de 1 mg/kg. La anfetamina (sulfato de D-anfetamina, Sigma) es disuelta (1 mg/ml) en NaCl 0,9% l prazosina (clorhidrato de prazosina, Sigma) es disuelta (1 mg/ml) en agua ultrapura y sujeta a nicación durante 15 min.

V Grupos experimentales

Todos nuestros estudios han sido realizados en tres grupos experimentales :

D1: « ratas no-sensibilizadas » las cuales han recibido una dosis de anfetamina el día 1.

D8: « ratas sensibilizadas » las cuales han recibido una dosis de anfetamina el día de la experimentación día 8), pero que habían ya recibido una dosis de anfetamina una semana antes (el día 1).

D1 **Prazosina**: éstas son ratas que han recibido una dosis de anfetamina el día 1 pero que han sido nyectadas con la prazosina 30 min antes de la administración de anfetamina.

Expresión y análisis estadístico de resultados

Todos los resultados están expresados por la media ± SEM.

Los resultados de la actividad locomotora representan el número de cortes de rayos infrarojos fectuados por la rata, los cuales son acumulados por periodos de 10 minutos. Solamente la actividad eambulatoria, que toma en cuenta los movimientos de desplazamiento del animal, es utilizada en uestros experimentos para cuantificar la actividad locomotora.

Los datos de las concentraciones de catecolaminas están expresados en porcentaje con respecto al alor basal, mismo que ha sido calculado para cada experimento al obtener la media de los seis valores ue preceden al cambio de la rata de su caja habitual al actímetro.

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tiempo y tratamiento) con medidas epetidas (curso temporal), para comparar tanto los resultados de la actividad locomotora como aquellos e las concentraciones de DA y NA, obtenidos para cada grupo experimental. El grado de significancia e estableció en 5% para todas las comparaciones realizadas.

RESULTADOS

. Respuesta conductual a un nuevo ambiente

Para estudiar la posible influencia de nuestras condiciones de experimentación sobre la conducta motora de la rata, comparamos la respuesta locomotora de ratas implantadas (n = 13) con respecto a quella de ratas no implantadas (n = 13) a partir de su introducción en un nuevo ambiente (cambio de la aja habitual al actímetro, ver figura 1 en página 10). La figura 2 muestra que las ratas responden de nanera similar a la novedad antes y después de la implantación de la sonda, manifestando al inicio una ctividad locomotora importante, la cual disminuye progresivamente y que se estabiliza al cabo de una ora. El análisis estadístico confirma que no existe diferencia significativa en la respuesta a la novedad e estos dos grupos [$F_{(1,24)} = 0.002$, n.s.].

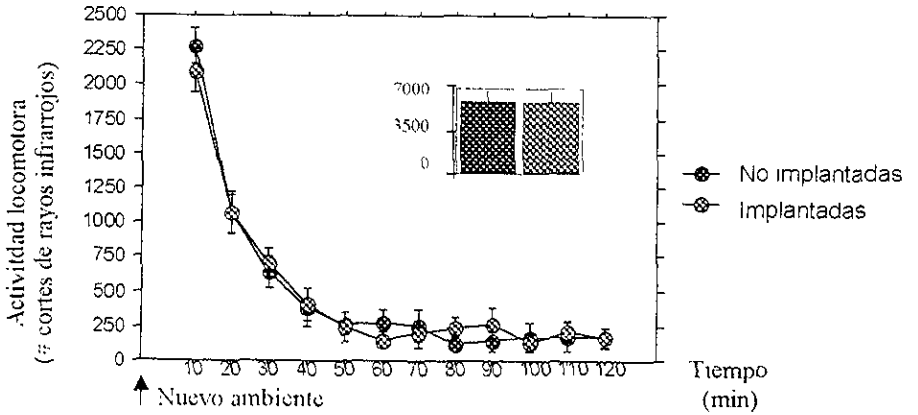


Figura 2 : Curso temporal de la respuesta conductual al nuevo ambiente de ratas implantadas y no implantadas. Los histogramas representan el cúmulo de la actividad locomotora a lo largo de dos horas.

. Respuesta conductual y neuroquimica a la anfetamina. D8 vs D1

1. Estudio conductual

Para llevar a cabo el estudio conductual medimos la actividad locomotora de dos grupos de ratas. 1 (« ratas no sensibilizadas », n 13) y D8 (« ratas sensibilizadas », n 6) durante cuatro horas

ontinuas. Las primeras dos horas corresponden a la respuesta al nuevo ambiente a partir del cambio de aja (t = 0), mientras que las dos horas que siguen a la administración de la anfetamina (t = 120) nuestran la respuesta conductual a esta droga (ver figura 1, página 10).

El curso temporal de la actividad locomotora provocada por la novedad se representa en la rimera parte (t = 0-120 min) de la figura 3a. En ella se puede observar que la respuesta locomotora al uevo ambiente ocurre de manera similar en los dos grupos de ratas, alcanzando su máximo mediatamente después del cambio de caja y disminuyendo progresivamente hasta su estabilización al ibo de dos horas. El análisis estadístico no indica ninguna diferencia significativa entre D1 y D8 en lo ue a la respuesta al nuevo ambiente se refiere [$F_{(1,17)} = 0,142$, n.s.].

En cuanto a la respuesta locomotora inducida por la anfetamina (t = 120-240) (Fig. 3a), ésta umenta significativamente en los animales del grupo D8 (« ratas sensibilizadas ») con respecto a los del rupo D1 (« ratas no sensibilizadas ») [$F_{(1,17)} = 5,457$, $p<0,05$]. La acumulación del número de cortes de yos infrarrojos en las ratas de D8 es superior en un 54% aproximadamente al de las ratas del grupo D1. pesar de que la respuesta a la anfetamina difiere entre D1 y D8, puede también observarse que el úmero máximo de cortes de rayos infrarrojos es alcanzado, para ambos grupos de ratas, 40 minutos spués de la inyección de anfetamina.

2. Estudio neuroquímico

Paralelamente al estudio conductual, hemos evaluado las concentraciones de catecolaminas en el ucleo accumbens de ratas de los grupos D1 (n = 4) y D8 (n = 5). Lo anterior lo hemos llevado a cabo a rtir de la hora que precede a la introducción al nuevo ambiente (ver figura 1, página 10). Las figuras y 3c representan respectivamente las variaciones en las concentraciones de DA y NA. Ninguna de tas dos concentraciones se ve modificada de manera significativa en respuesta al nuevo ambiente para s dos grupos de ratas (DA: D1 [$F_{(12,60)} = 1,022$, n.s.], D8 [$F_{(12,48)} = 1,282$, n.s.] ; NA: D1 [$F_{(12,36)} = 0,467$, s.], D8 [$F_{(12,48)} = 1,000$, n.s.]). Por el contrario, la inyección de anfetamina provoca un incremento portante en las concentraciones de DA y NA. En el caso de la DA, este incremento es mas importante las « ratas sensibilizadas » (D8) que en las « ratas no sensibilizadas » (D1); sin embargo, este cremento no llega a alcanzar una diferencia significativa entre las respuestas de los dos grupos de ratas [$F_{(1,8)} = 4,043$, $p = 0,08$]. En el caso de la NA, las diferencias entre D1 y D8 no son tan evidentes [$F_{(1,8)} = 0,187$, n.s.]. Para ambos grupos, el incremento máximo de la actividad locomotora se alcanza 20 nutos despues de la inyección de anfetamina.

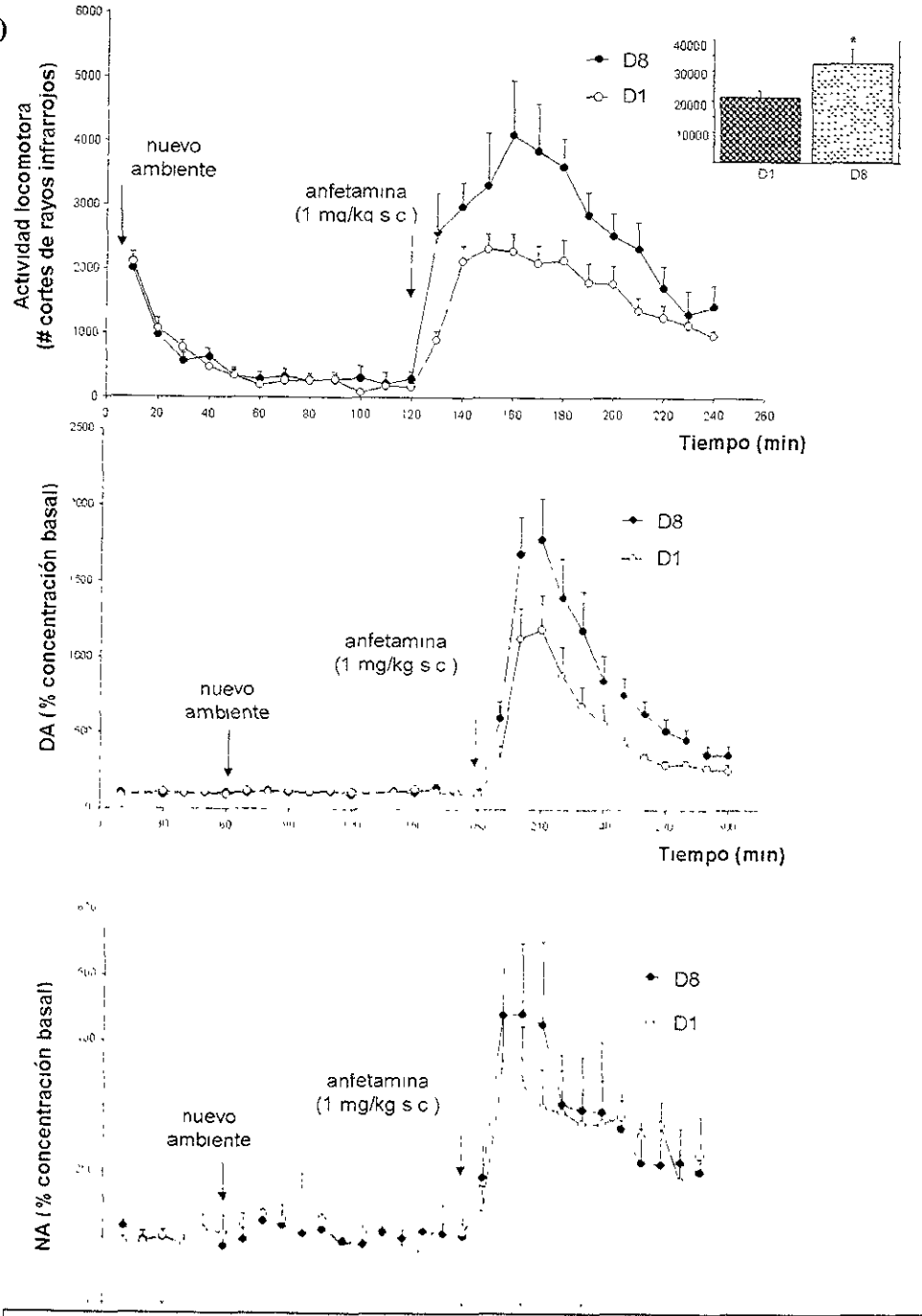


Figura 3 : Curso temporal de la respuesta conductual (**a**) y neuroquímica (**b** para la DA et **c** para la NA) al nuevo ambiente y a la anfetamina en el momento de la administración el día 1 (D1) o de la reexposición el día 8 (D8). Los histogramas representan el cúmulo de la actividad locomotora a lo largo de dos horas. (**b**) 100 % DA (D1: 1,89 ± 0,65 10⁻⁷ M; D8: 1,11 ± 0,32 10⁻⁷ M). (**c**) 100 % NA (D1: 2,89 ± 0,97 10⁻⁷ M; D8: 1,11 ± 1,00 10⁻⁷ M).

II. Efecto de la prazosina en la respuesta conductual y neuroquímica inducida por la anfetamina. D1 vs D1 Prazosina

1. Estudio conductual

La figura 4 representa el efecto de un tratamiento previo con prazosina (t = -30 min) en la activación locomotora inducida por una inyección de anfetamina (t = 0). La hiperlocomoción inducida por la anfetamina disminuye significativamente en las ratas que fueron tratadas previamente con la prazosina (grupo D1 Prazosina, n = 5) con respecto a las ratas que no recibieron ningún tratamiento previo (grupo D1, n = 13) [$F_{(1,16)} = 4{,}437$, $p<0{,}05$].

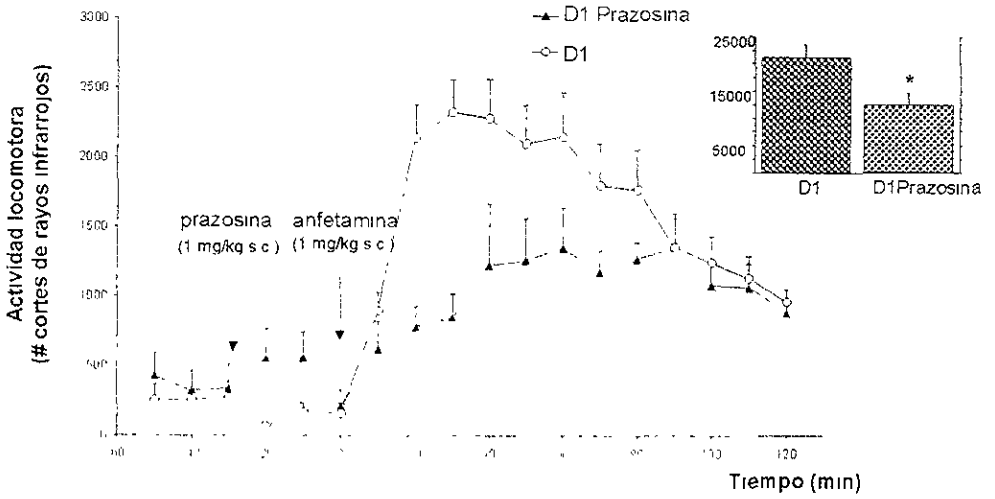


Figura 4 : Curso temporal de la respuesta conductual y neuroquímica a la anfetamina con la aplicación de un tratamiento previo de prazosina 30 min antes de la inyección de anfetamina (D1 Prazosina), comparada con la respuesta de ratas del grupo D1 sin tratamiento previo. Los histogramas representan el cúmulo de la actividad locomotora a lo largo de dos horas

2. Estudio neuroquímico

Una sola inyección de anfetamina el día 1 provoca un aumento de la DA y de la NA tanto en las ratas que recibieron un tratamiento previo con prazosina 30 minutos antes de la administración de anfetamina (n = 4) como en las ratas que no recibieron ningún tratamiento previo (n = 5) (Fig. 5a y 5b). Es posible observar que el incremento de DA inducido por la anfetamina en las ratas del grupo

D1 Prazosina es menor con respecto al de las ratas que no siguieron el tratamiento con prazosina (D1), ún si esta diferencia no es significativa estadísticamente [$F_{(16)} = 2,763$, n s] En cambio, el aumento de NA sí es significativamente mayor en las ratas tratadas previamente con prazosina que en las ratas que o siguieron tratamiento alguno con esta droga [$F_{(1,16)} = 4,906$, $p<0,05$].

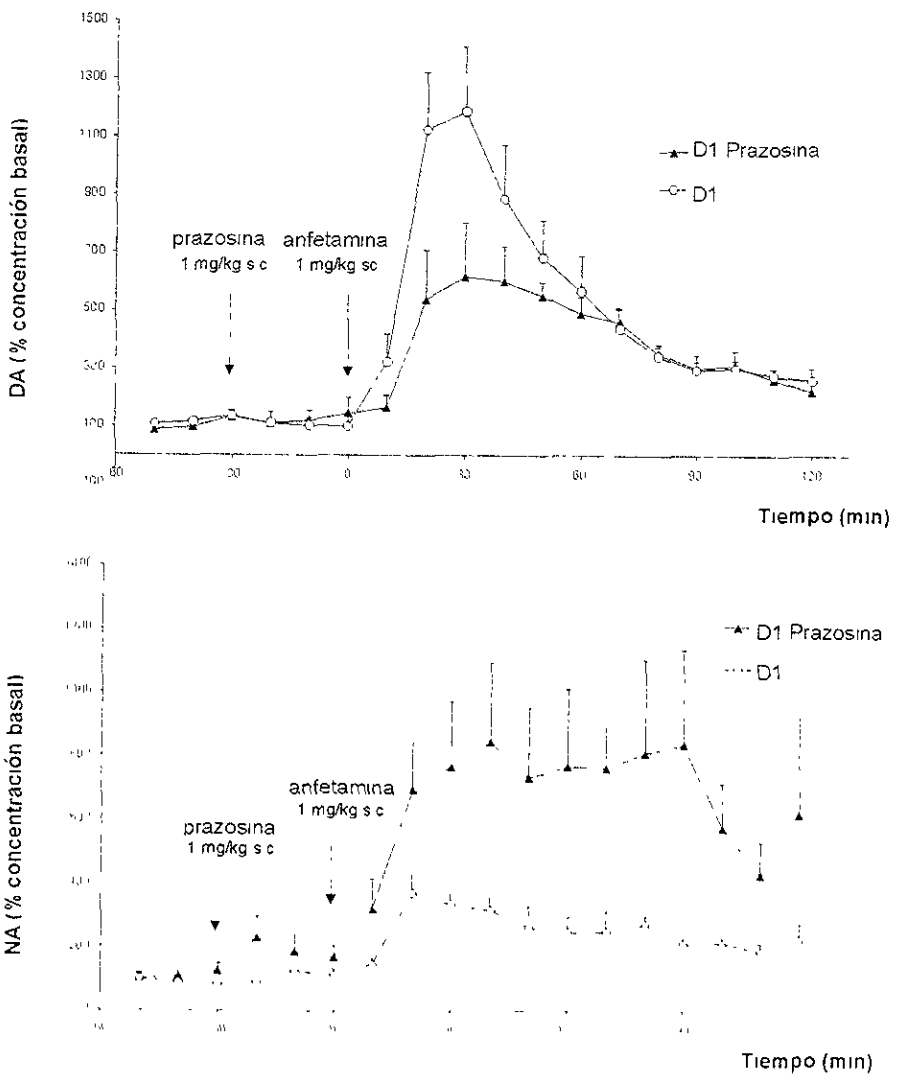


Figura 5 : Curso temporal de la respuesta neuroquímica a la anfetamina (**a** para la DA, **b** para la NA) con la aplicacion de un tratamiento previo de prazosina 30 min antes de la inyeccion de anfetamina (D1 Prazosina), comparada con la respuesta de ratas del grupo D1 sin tratamiento previo (**a**) 100 % DA (D1 Prazosina 1,58 ± 0,13 10⁻⁷ M, D1 1,89 ± 0,65 10⁻⁷ M) (**b**) 100 % NA (D1 Prazosina 1,66 ± 1,2 10⁻⁷ M, D1 2,89 ± 0,97 10⁻⁷ M)

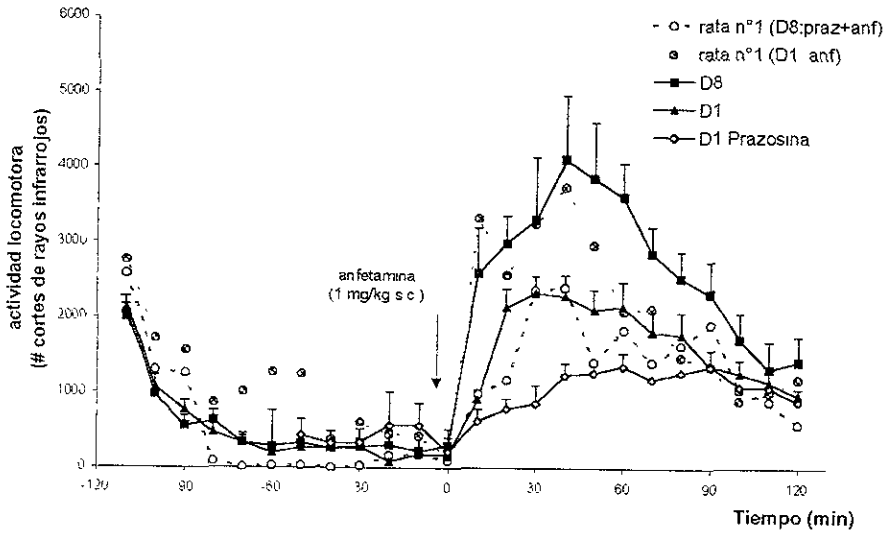
Efecto de la prazosina en la respuesta conductual a la anfetamina a lo largo de la sensibilización : estudio preliminar

1. Administración de prazosina en D8

Los resultados obtenidos con una sola rata (rata n° 1), que había ya recibido una inyección de fetamina el día 1 y que fue tratada con prazosina 30 minutos antes de la administración de anfetamina día 8, están representados por la figura 6a. En ella es posible notar que cuando la inyección de fetamina en D8 es precedida por la inyección de prazosina, la hiperlocomoción inducida por la fetamina es más parecida a la curva media del grupo D1 (« ratas no sensibilizadas ») que a la del ıpo D8 (« ratas sensibilizadas »). Además, la hiperlocomoción inducida por la anfetamina el día 8 es erior a aquella obtenida el día 1 en la misma rata

2 Administración de prazosina en D1

Para saber si la prazosina es capaz de impedir el establecimiento de la sensibilización a la fetamina, examinamos la actividad locomotora de una rata (rata n° 2), la cual recibió tanto prazosina no anfetamina el día 1, pero sólo anfetamina el día 8. A pesar de que la hiperlocomoción inducida por anfetamina se ve incrementada el día 8 con respecto al día 1, esta respuesta no llega a ser igual de portante que la que manifiestan las ratas sensibilizadas (D8) (Fig. 6b).



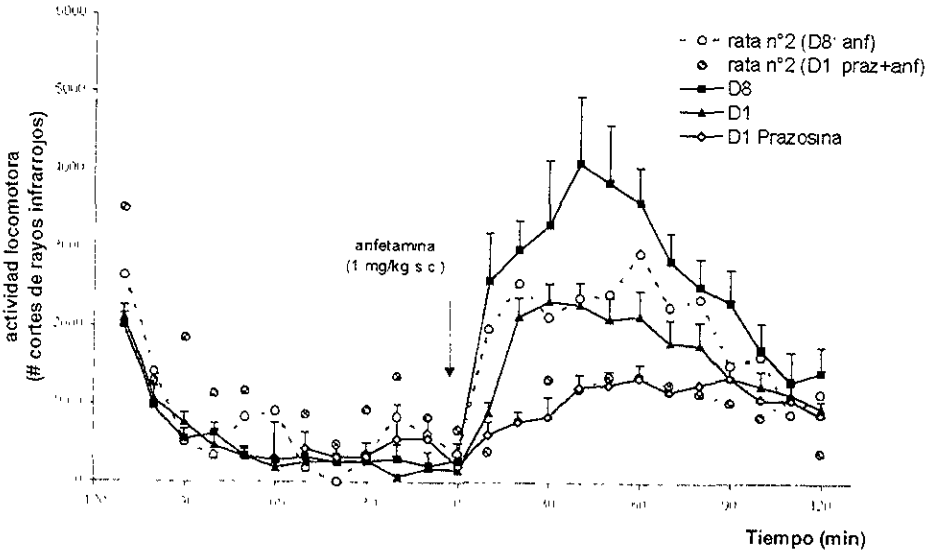


Figura 6 Curso temporal de la respuesta conductual a la anfetamina con la aplicacion de un tratamiento previo de prazosina el dia 8 **(a)** y el dia 1 **(b)** Comparasion con las respuestas obtenidas por los grupos D1, D8 y D1 Prazosina

DISCUSION

El presente trabajo se realizó con el fin de evaluar las alteraciones en la transmisión opaminérgica y noradrenérgica en el núcleo accumbens a lo largo del fenómeno de sensibilización onductual a la anfetamina.

El enfoque experimental utilizado en este estudio, la microdiálisis intracerebral en libre ovimiento, presenta un gran interés puesto que gracias a éste hemos podido seguir al mismo tiempo las odificaciones tanto neuroquímicas como conductuales del animal. Además, el hecho de trabajar con imales en estado de vigilia nos libera de cualquier interferencia de los efectos de la anestesia con el enómeno que estudiamos. De hecho, se ha mostrado que algunos anestésicos como el hidrato de cloral lteran el funcionamiento de los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico (Van Gaalen et al., 1997 ; hi et al., 2000).

Si bien la DA extracelular ha sido determinada previamente a nivel del núcleo accumbens en umerosos estudios de microdiálisis, muy pocos han podido estudiar las concentraciones de NA en dicha structura. Esto puede deberse a que los métodos de análisis de catecolaminas clásicamente utilizados HPLC con detección electroquímica) no son lo suficientemente sensibles como para detectar las equeñas concentraciones de NA presentes en esta región cerebral. La técnica CE-LIFD utilizada para el nálisis de nuestros dialisados, nos ha permitido detectar las concentraciones tanto de DA como de NA n el núcleo accumbens a lo largo de nuestros experimentos.

Existen diversos protocolos utilizados con el fin de inducir una sensibilización conductual a la nfetamina. La mayoría de ellos consisten en la administración repetida e intermitente de anfetamina urante un periodo que puede variar entre 3-15 días, seguido de un periodo de privación de al menos una emana (Pierce and Kalivas, 1997) Sin embargo, dichos protocolos pueden llegar a ser tediosos cuando aplican en experimentos neuroquímicos *in vivo* como el nuestro en los que se utilizan ratas en libre ovimiento. Lo anterior, debido a que cada experimento se realiza con un solo animal y a que cada imal requiere una preparación previa a la experimentación y un tiempo de recuperación de alrededor) días. Recientemente, Vanderschuren y col. (1999) han superado estos protocolos al demostrar que a inyección de anfetamina (5 mg/kg) y un periodo de privación de una semana son suficientes para ducir una sensibilización conductual, expresada al momento de la reexposición a esta droga (1 mg/kg). n nuestro caso, nosotros hemos querido probar un protocolo similar, con la diferencia de que en el esente protocolo utilizamos la misma dosis de anfetamina (1 mg/kg) para las dos inyecciones; ésto con finalidad de poder realizar comparaciones entre los resultados obtenidos antes y después de la nsibilización

En un principio, y con el fin de verificar que nuestro procedimiento experimental de microdiálisis o modifica en sí mismo la conducta del animal, examinamos las respuestas de las ratas al nuevo mbiente antes y después de ser implantadas con una sonda de microdiálisis. Los datos obtenidos nuestran claramente que dicha respuesta no es modificada cuando los animales son sometidos a nuestras ondiciones experimentales, lo cual sugiere que bajo este modelo pueden realizarse estudios onductuales confiables simultáneamente a los estudios neuroquímicos.

En la primera parte de nuestro trabajo, evaluamos simultáneamente la conducta motora de la rata nediante actimetría y las concentraciones extracelulares de DA y NA en el núcleo accumbens mediante nicrodiálisis. Esto lo hemos realizado en respuesta tanto a la inyección aguda de anfetamina (en D1) omo a la readministración de una misma dosis de esta droga (en D8) en ratas que habían ya recibido na inyección de anfetamina el día 1.

Desde un punto de vista conductual, demostramos que las ratas expuestas previamente a la nfetamina manifiestan una respuesta locomotora acrecentada con respecto a las ratas que sólo ecibieron la anfetamina el día 1. Por lo tanto, es posible afirmar que en nuestras condiciones xperimentales las ratas han sido sensibilizadas a la anfetamina. El grado de sensibilización obtenido en uestro modelo es del mismo orden que el de otros estudios meramente conductuales en los que se tiliza un protocolo de administración repetida e intermitente de anfetamina (Panayi et al., in press). Este s un argumento clave que valida nuestro modelo experimental.

Desde un punto de vista neuroquímico, hemos observado que la administración aguda de nfetamina provoca un aumento importante de la dopamina en el núcleo accumbens. Este resultado oncuerda con otras observaciones descritas en la literatura (Darracq, 1998 ; Di Chiara and Imperato, 998). Paralelamente al incremento de la concentración de DA en el núcleo accumbens, hemos también uesto en evidencia un aumento de la concentración de noradrenalina Dicho efecto era de esperarse uesto que uno de los mecanismos de acción de la anfetamina es el de inhibir el transportador de la NA. demás, varios estudios han podido demostrar *in vivo* un aumento de la NA en respuesta a la anfetamina n otras áreas cerebrales como el hipocampo y la corteza prefrontal (Florin et al., 1994, Camp et ., 1997, Kuczenski and Segal, 2001). Sin embargo, sólo un estudio *in vitro* realizado sobre cortes erebrales del núcleo accumbens ha podido mostrar un aumento de la concentración extracelular de NA n respuesta a la anfetamina (Vanderschuren et al., 1999). Así, el presente estudio es el primero en ostrar *in vivo* un incremento de la NA en el núcleo accumbens luego de la administración aguda de nfetamina.

Es importante señalar que el incremento de la NA (300%) inducido por la anfetamina es menos nportante que aquel obtenido para la DA (1300%), lo cual concuerda con la densidad de la inervación

noradrenérgica en el núcleo accumbens (Berridge et al., 1997 ; Delfs et al., 1998), que es menor con respecto a la inervación dopaminérgica que recibe este núcleo (Grace, 2000).

Con relación a la respuesta neuroquímica provocada por una reexposición a la anfetamina, los animales del grupo D8 parecen mostrar una sensibilización de la transmisión dopaminérgica en el núcleo accumbens, es decir, un incremento de su concentración con respecto a D1. Sin embargo, lo anterior deberá ser confirmado con un mayor número de animales puesto que en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico. Nuestros resultados parecen estar en acuerdo con los trabajos de Robinson et al. (1988), los cuales pusieron inicialmente en evidencia la existencia de un aumento de DA debido a la sensibilización en el cuerpo estriado ventral, región que corresponde actualmente al núcleo accumbens. En años más recientes, otros estudios realizados en distintas regiones del núcleo accumbens han mostrado también un incremento de la concentración extracelular de DA en la región de "shell" (Pierce and Kalivas, 1997) o "core" del núcleo accumbens (Cadoni et al., 2000). En ambos casos, el incremento de la liberación de DA inducido por la anfetamina no es demasiado importante, lo cual es compatible con la idea de que las modificaciones de la transmisión dopaminérgica a lo largo de la sensibilización podrían ocurrir no solamente a nivel presináptico sino también a nivel postsináptico. Por ejemplo, algunos estudios indican que los receptores dopaminérgicos D1 del núcleo accumbens, cuya estimulación parece ser necesaria para la expresión de la sensibilización conductual a los psicoestimulantes, se vuelven hipersensibles luego de administrar la anfetamina (Pierce and Kalivas 1997, Vandershuren and Kalivas, 2000).

En lo que concierne a la noradrenalina liberada en respuesta a la administración de anfetamina, nuestros resultados muestran que no existen diferencias entre las ratas sensibilizadas y las no sensibilizadas. Como en el caso de la administración aguda de anfetamina, hasta ahora no se ha realizado ningún otro trabajo en el que se estudien las posibles modificaciones de la liberación de NA a nivel del núcleo accumbens en respuesta a este psicoestimulante durante el fenómeno de sensibilización conductual.

En la segunda parte de nuestro trabajo, estudiamos el efecto de la prazosina, un antagonista de los receptores adrenérgicos alfa-1, en las respuestas neuroquímica y conductual a la anfetamina. A pesar de que en la primera parte de nuestro trabajo no logramos observar las posibles modificaciones de la transmisión noradrenérgica en el núcleo accumbens después de la sensibilización a la anfetamina, diversos estudios han puesto en evidencia que dicho agente farmacológico es capaz de disminuir el efecto locomotor de la anfetamina (Sommermeyer et al., 1995, Darracq et al., 1998, Kuczenski and Segal, 2001). Igualmente, en el presente estudio hemos podido mostrar que la administración de prazosina atenúa la hiperactivación locomotora inducida por la anfetamina. Nuestro trabajo confirma así

implicación de los receptores adrenérgicos alfa-1 en el efecto locomotor de la anfetamina, apoyando i la idea de que el sistema noradrenérgico participa en la respuesta conductual a los psicoestimulantes.

Desde un punto de vista neuroquímico, en las ratas tratadas previamente con prazosina pudimos otar una disminución en el incremento de DA inducido por la anfetamina en el núcleo accumbens, así mo un aumento en el incremento de NA. En lo que concierne a la dopamina, el efecto observado en estro estudio, el cual queda por ser confirmado con un mayor número de animales, no pudo ser tectado por Darracq et al. (1998). Lo anterior podría haberse debido a que en dicho estudio se ilizaron dosis más bajas (0,5 mg/kg) tanto de prazosina como de anfetamina.

Es importante destacar que la administración de prazosina no modifica en sí misma la ncentración de DA antes de inyectar la anfetamina. Esto concuerda con otros resultados descritos en la eratura (Sommermeyer et al.,1995, Mathé et al., 1996) y sugiere que el bloqueo de los receptores a-1 podría tener una influencia selectiva en la liberación de DA inducida por la anfetamina. Lo terior apoya la hipótesis hecha por Mathé et al (1996) en la que se propone que los antagonistas de los ceptores adrenérgicos alfa-1 podrían disminuir la sensibilidad del sistema dopaminérgico solamente ando éste se ve sometido a una situación de reto farmacológico.

Por otro lado, los efectos de la prazosina en la liberación de noradrenalina inducida por la fetamina no han sido descritos en otros estudios hasta ahora. El aumento marcado que observamos en concentración de NA en el núcleo accumbens en ratas tratadas previamente con la prazosina requiere n de una explicación. Por lo tanto, es necesario que se realicen otros estudios en los que se tome en enta no solamente a la DA sino también a la NA, para así comprender mejor la interacción de estos s sistemas en los mecanismos de acción de los psicoestimulantes.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos sobre el efecto de la prazosina en la administración uda de anfetamina, consideramos interesante examinar también los efectos de este agente macológico a lo largo de la sensibilización a la anfetamina. Los resultados obtenidos son muy liminares puesto que hasta ahora sólo se ha evaluado la respuesta conductual de dos ratas. Ambas ibieron una inyección de anfetamina el día 1 y el día 8, además de haber seguido también un tamiento previo con la prazosina: el día 8 para la rata n°1 y el día 1 para la rata n°2. En el primero de casos, la rata n°1 mostró una conducta motora similar a la de las ratas no sensibilizadas en lugar de ponder como una rata sensibilizada. Este resultado sugiere que la prazosina podría ser capaz de nuar la expresión de la sensibilazión a la anfetamina.

La segunda rata (rata n°2), la cual recibió un tratamiento previo con la prazosina únicamente el 1, no solamente muestra una disminución en la respuesta locomotora a la anfetamina el día 1 sino bién el día 8; ésto quiere decir que los efectos de la prazosina persistieron una semana después de su ministración. La conducta de esta rata el día 8 se acerca más a la de las ratas no sensibilizadas en lugar

parecerse a la de las ratas sensibilizadas. Lo anterior sugiere que la prazosina podría no solamente ibir la expresión de la sensibilización conductual a la anfetamina, sino también la iniciación o ablecimiento de dicho fenómeno. Evidentemente, un mayor número de experimentos son necesarios :a poder confirmar estos resultados preliminares realizados a nivel conductual, estudios que podrían · llevados a cabo adicionalmente a nivel neuroquímico con el fin de investigar los mecanismos ponsables de los efectos de la prazosina.

CONCLUSIONES

El presente estudio contribuye a la comprensión del fenómeno de sensibilización conductual a la fetamina tanto a nivel neuroquímico como conductual. Primeramente, establecimos un modelo perimental que permite el estudio simultáneo de los aspectos neuroquímicos y conductuales de la nsibilización a los psicoestimulantes. Este modelo podría también ser empleado en un futuro para tudiar la sensibilización a otras drogas (opiáceos, alcohol, nicotina, etc.), así como para realizar perimentos de sensibilización cruzada entre ellas. En segundo lugar, pudimos confirmar mediante este odelo la existencia de modificaciones en las concentraciones extracelulares de DA en el núcleo cumbens en respuesta a la anfetamina. Asimismo, demostramos por primera vez en esta región rebral, la existencia de modificaciones en la transmisión noradrenérgica. Finalmente, mostramos que efecto inhibidor de la prazosina, un antagonista de los receptores adrenérgicos alfa1, sobre la peractividad locomotora inducida por la anfetamina, puede estar asociado a modificaciones de la ansmisión no sólo dopaminérgica sino también noradrenérgica a nivel del núcleo accumbens.

La sensibilización a los psicoestimulantes es considerada como un modelo animal de pendencia por abuso de drogas y de psicosis inducida por fármacos en el hombre. El estudio de las teraciones de los sistemas noradrenérgico y dopaminérgico a lo largo del fenómeno de sensibilización la anfetamina deberá conducirnos a una mejor comprensión no sólo de los mecanismos responsables la adicción, sino también a un mejor conocimiento de la etiología de ciertas patologías psiquiátricas las que se involucran dichos sistemas.

REFERENCIAS

ercrombie ED, Finlay JM (1991) Monitoring extracellular norepinephrine in brain using in vivo microdialysis and HPLC-EC. In :Microdialysis in the Neurosciences. (Robinson TE, Justice Jr JB, Eds), Amsterdam :Elsevier ; pp253-274.

nara SG, Kuhar MJ (1993) Neurotransmitter transporters: recent progress. Annu Rev Neurosci 16: 73-93.

rridge CW, Stradford TL, Foote SL, Kelley AE (1997) Distribution of dopamine beta-hydroxylase-like immunoreactive fibers within the shell subregion of the nucleus accumbens Synapse 27: 230-41.

irrot M (1998) Transmission dopaminergique: influence des glucocorticoïdes et heterogeneité striatale. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux 2, 112 p.

lanc G, Trovero F, Vezina P, Hervé D, Godeheu AM, Glowinski J, Tassin JP (1994) Blockade of prefronto-cortical α1-adrenergic receptors prevents locomotor hyperactivity induced by subcortical d-amphetamine injection. Eur J Neurosci 6: 293-298.

adoni C, Solinas M, Gaetano DC (2000) Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. Eur J Pharmacol 388: 69-76.

amp DM, DeJonghe DK, Robinson TE (1997) Time-dependent effects of repeated amphetamine treatment on norepinephrine in the hypothalamus and hippocampus assessed with in vivo microdialysis. Neuropsychopharmacology 17: 130-40.

'arboni E, Spielewoy C, Vacca C, Nosten-Bertrand M, Giros B, Di Chiara G (2001) Cocaine and amphetamine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens of mice lacking the dopamine transporter gene J Neurosci 21: RC141: 1-4.

)arracq L (1999) La liberation fonctionnelle de dopamine dans le noyau accumbens: rôle des transmissions noradrénergique et glutamatergique. Thèse de Doctorat, Université de Paris VI, 131 p.

)arracq L, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP (1998) Importance of the noradrenaline-dopamine coupling in the locomotor activating effects of d-amphetamine. J Neurosci 18: 2729-2739.

elfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones GS (1998) Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat Brain Res 806: 127-140.

eldman RS, Meyer JS, Quenzer LF (1997) Stimulants: amphetamine and cocaine. In "Principles of Neuropsychopharmacology" Sinauer Associates, pp 549-590.

orino DF, Philips AG (1999) Facilitation of sexual behavior and enhanced dopamine efflux in the nucleus accumbens of male rats after d–amphetamine–induced behavioral sensitization. J Neurosci 19: 456-463.

orin SM, Kuczensky R, Segal DS (1994) Regional extracellular norepinephrine responses to amphetamine and cocaine and effects of clonidine pretreatment. Brain Res 654: 53-62.

iros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. Nature 379: 606-612.

race AA (2000) Gating of information flow within the limbic system and the pathophysiology of schizophrenia. Brain Res Rev 31: 330-341.

offman BB (1992) Adenoceptor–activating drugs. In "Basic & clinical pharmacology", Katzung BG, Appleton & Lange, pp. 109-123.

nes IR, Nickerson M (1975) Norepinephrine, epinephrine, and the sympathomimetic amines. In "The pharmacological basis of therapeutics" Goodman LS, Gilman A, Macmillan Publishing Co, pp 477-513.

nes SR, Gainetdinov RR, Wightman RM, Caron MG (1998) Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter J Neurosci 18: 1979-1986.

uczensky R, Segal DS (1999) Sensitization of amphetamine–induced stereotyped behaviors during the acute response: role of D1 and D2 dopamine receptors. Brain Res 822: 167-74.

uczensky R, Segal DS (2001) Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine J Pharmacol Exp Ther 296: 876-883.

athé JM, Nomikos GG, Hildebrand BE, Hertel P, Svensson TH (1996) Prazosin inhibits MK–801–induced hyperlocomotion and dopamine release in the nucleus accumbens. Eur J Pharmacol 309: 1-11.

ve MF, Mehmert KK, Hodge CW (2000) Microdialysis in the mouse nucleus accumbens: a method for detection of monoamine and amino acid neurotransmitters with simultaneous assessment of locomotor activity. Brain Res Protoc 5: 16-24.

nayi F, Dorso E, Lambás-Señas L, Renaud B, Scarna H, Bérod A (2001) Chronic blockade of Neurotensin receptors strongly reduces sensitized, but not acute, behavioral response to d-amphetamine. Neuropsychopharmacology (sous presse)

ulson EP, Robinson TE (1995) Amphetamine induced time dependent sensitization of dopamine neurotransmission in the dorsal and ventral striatum: a microdialysis study in behaving rats. Synapse 19: 56-65.

ierce RC, Kalivas PW (1997) A circuitry of the expression of behavioral sensitization to amphetamine–like psychostimulants. Brain Res Rev 25: 192-216.

orrino LJ, Lucignani G, Don-Edwards D, Sokoloff L (1984) Correlation of dose-dependant effects of acute amphetamine administration on behavior and local cerebral metabolism in rats. Brain Res 307: 311-320.

obinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive–sensitization theory of addiction. Brain Res Rev 18: 247-291.

obinson TE, Jurson PA, Bennet JA, Bengten KM (1988) Persistent sensitization of dopamine neurotransmission in ventral striatum (nucleus accumbens) produced by prior experience with (+)–amphetamine: a microdialysis study in freely moving rats. Brain Res 462: 211-22.

egal DS, Kuczensky R (1992) In vivo microdialysis reveals a diminished amphetamine–induced DA response corresponding to behavioral sensitization produced by repeated amphetamine pretreatment. Brain Res 571: 330-7.

ni WX, Pun CL, Zhang XX, Jones MD, Bunney BS. (2000) Dual effects of D-amphetamine on dopamine neurons mediated by dopamine and nondopamine receptors. J Neurosci : 20(9):3504-11.

ommermeyer H, Frielingsdorf J, Knorr A (1995) Effects of prazosin on the dopaminergic neurotransmission in rat brain. Eur J Pharmacol 276: 267-270.

nda G, Pontieri FE, Frau R, Di Chiara G (1997) Contribution of blockade of the noradrenaline carrier to the increase of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex by amphetamine and cocaine. Eur J Neurosci 9: 2077-2085.

instra T, Cools AR (2000) Newly synthesized dopamine in the nucleus accumbens is regulated by β adrenergic, but not α adrenergic, receptors. Neuroscience 98: 743-747.

n Gaalen M, Kawahara H, Kawahara Y, Westerink BH (1997) The locus coeruleus noradrenergic system in the rat brain studied by dual-probe microdialysis. Brain Res. 18, 763(1):56-62

nderschuren LJ, Wardeh G, De Vries TJ, Mulder AH, Schoffelmeer AN (1999) Opposing role of dopamine D1 and D2 receptors in modulation of rat nucleus accumbens noradrenaline release. J Neurosci 19, 4123-4131.

nderschuren LJ, Schmidt ED, De Vries TJ, Van Moorsel CA, Tilders FJ, Schoffelmeer AN (1999) A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. J Neurosci 19: 9579-9586.

nderschuren LJMJ, Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. Psychopharmacology 151: 99-120.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

ei-Xing S, Chen-Lun P, Xue-Xiang Z, Jones MD, Bunney BS (2000) Dual effects of d–amphetamine on dopamine neurons mediated by dopamine and nondopamine receptors. J Neurosci 20: 3504-3511.

olf ME, White FJ, Nassar R, Brooderson RJ, Khansa MR (1993) Differential development of autoreceptor subsensitivity and enhanced dopamine release during amphetamine sensitization. J Pharmacol Exp Ther 264: 249-55.

u F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM. Miller GW, Wang Y-M, Caron MG (2000) Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. Nat Neurosci 3: 465-471.

amamoto BK, Novotney S (1998) Regulation of extracellular dopamine by the norepinephrine transporter J Neurochem 71. 274-279.