



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIA**

**“ROL DE LA VASOPRESINA EN RECAÍDA POR ANFETAMINA EN RATAS ADOLESCENTES
SPRAGUE-DAWLEY”**

Andrea Jesús Fuentes Poblete

**Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Directora de Tesis:
GEORGINA MARÍA RENARD**

Centro de Investigación Biomédica y Aplicada (CIBAP), Universidad de Santiago

**Co-Director de Tesis:
RAMÓN SOTOMAYOR-ZÁRATE**

Centro de Neurobiología y Fisiopatología Integrativa (CENFI), Universidad de Valparaíso

Valparaíso, julio de 2023

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento infinito a mi tutora la Dra. Georgina Renard, por creer en mí y recibirme en su laboratorio. Por enseñarme, aconsejarme y apoyarme en este arduo proceso con altas y bajas.

Agradezco a mi tutor el Dr. Ramón Sotomayor-Zárate, quien me apoyó y me entregó toda su disposición para realizar mi tesis en la Universidad de Santiago; por prestarme los aparatos de CPP, que sin ellos sinceramente no podría haber realizado esta tesis, y por sus consejos y aportes para continuar mejorando mi trabajo.

Agradezco enormemente a mis compañeras de laboratorio: Claudia Sanhueza, Daniela Cáceres, Tamara Bahamonde y Valeska Cid-Jofré, quienes con su paciencia me enseñaron desde pipetear hasta el compañerismo en el laboratorio; sin la ayuda de todas ustedes esta tesis no podría haber sido posible.

El presente estudio fue apoyado por DICYT Regular 022101RSSA otorgado por la Universidad de Santiago de Chile (USACH) a G.M.R, Beca de Magister Nacional N° 22220486 otorgada por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) a Andrea Fuentes Poblete, y financiamiento parcial de la Universidad de Valparaíso Beca DIUV-CI N°01/2006 y por FONDECYT N°120-0474 otorgado por ANID a R.S.Z.

INDICE

1.	RESUMEN	5
2.	ABSTRACT.....	6
3.	INTRODUCCIÓN.....	7
3.1	ADOLESCENCIA Y VULNERABILIDAD A ADICCIÓN A DROGAS	8
3.2	PSICOESTIMULANTES: ANFETAMINA (AMPH).....	8
3.3	VASOPRESINA	10
3.4	VASOPRESINA EN ADICCIÓN	10
3.5	ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE VASOPRESINA	11
4.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	12
5.	HIPÓTESIS.....	12
6.	OBJETIVOS.....	12
6.1	OBJETIVO GENERAL.....	12
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
7.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
8.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
8.1	REACTIVOS	14
8.2	ANIMALES	14
8.3	PREFERENCIA DE LUGAR CONDICIONADO (CPP).....	14
8.4	ADMINISTRACIÓN INTRANASAL	15
8.5	EXTRACCIÓN DE TEJIDO.....	16
8.6	CUANTIFICACIÓN DE DOPAMINA Y DOPAC.....	16
8.7	CUANTIFICACIÓN DE GABA Y GLUTAMATO	17
8.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
9.	RESULTADOS.....	18
9.1	PESO DE LOS ANIMALES	18
9.2	EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE AVP EN RECAÍDA POR AMPH	19
9.3	CONTENIDO DE NEUROTRANSMISORES Y METABOLITOS	21
9.3.1	CONTENIDO DE GLUTAMATO EN NÚCLEO ACCUMBENS	21
9.3.2	CONTENIDO DE GABA EN NÚCLEO ACCUMBENS.....	22
9.3.3	CONTENIDO DE DA Y DOPAC EN NÚCLEO ACCUMBENS	23
9.3.4	CONTENIDO DE GLUTAMATO EN ÁREA TEGMENTAL VENTRAL	24

9.3.5	CONTENIDO DE GABA EN ÁREA TEGMENTAL VENTRAL	25
9.3.6	CONTENIDO DE DA Y DOPAC EN ÁREA TEGMENTAL VENTRAL	26
9.3.7	CONTENIDO DE GLUTAMATO EN CORTEZA PRE-FRONTAL	27
9.3.8	CONTENIDO DE GABA EN CORTEZA PRE-FRONTAL	28
9.3.9	CONTENIDO DE DA Y DOPAC EN CORTEZA PRE-FRONTAL.....	29
9.3.10	CONTENIDO DE GLUTAMATO EN ESTRIADO DORSAL.....	30
9.3.11	CONTENIDO DE GABA EN ESTRIADO DORSAL	31
9.3.12	CONTENIDO DE DA Y DOPAC EN ESTRIADO DORSAL	32
10.	DISCUSION.....	33
10.1	EFFECTOS DE AVP SOBRE CONDUCTA DE RECAIDA A ANFETAMINA	33
10.2	EFFECTOS NEUROQUÍMICOS	34
11.	CONCLUSIONES.....	36
12.	BIBLIOGRAFÍA	37
13.	ANEXOS	42
13.1	RESULTADOS CONDUCTUALES Y NEUROQUÍMICOS EN HEMBRAS.....	42
13.3	ACTAS DE BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD	46

1. RESUMEN

La adolescencia es un período vulnerable para el abuso de drogas y para el desarrollo de dependencia o adicción a las drogas. La anfetamina (AMPH) es una sustancia psicoactiva, a menudo utilizada como droga recreativa por jóvenes. No obstante, no existen medicamentos efectivos para el tratamiento de la adicción a AMPH y otras drogas psicoestimulantes. Estudios recientes han demostrado que el sistema vasopresinérgico juega un papel importante en la adicción a las drogas, adquiriendo un gran interés como blanco terapéutico. Así, esta investigación tuvo como objetivo estudiar el efecto de la administración intranasal de vasopresina (AVP), durante la fase de extinción de la preferencia de lugar condicionado, en la reinstauración inducida por AMPH. Ratas Sprague-Dawley adolescentes machos (43-45 PND) fueron condicionados con AMPH (1.5 mg/kg i.p.) o solución salina durante 5 días. Luego, durante 5 días de extinción, los animales recibieron tratamiento con AVP intranasal (20 µg/kg) o solución salina. Posterior a la fase de extinción, se indujo una reinstauración con una inyección de AMPH. Los niveles de glutamato, GABA, dopamina y DOPAC, se cuantificaron en núcleo accumbens (NAc), área tegmental ventral (VTA), corteza prefrontal (PFC) y estriado dorsal. Los resultados sugieren que la administración intranasal de AVP, durante la fase de extinción, bloquea parcialmente la reinstauración de CPP o el comportamiento de búsqueda de drogas en ratas macho. Es posible que este efecto esté dado por la disminución de la actividad de NAc y PFC. Asimismo, AVP podría actuar inhibiendo la liberación de glutamato en el VTA a través del aumento del tono GABAérgico de las interneuronas del mismo.

PALABRAS CLAVES

Anfetamina, Preferencia de lugar condicionado, Vasopresina, Administración intranasal, Adolescencia, Reinstauración.

2. ABSTRACT

Adolescence is a vulnerable period for drug abuse and the development of drug dependence or addiction. Amphetamine (AMPH) is a psychoactive substance commonly used as a recreational drug by young individuals. However, there is a lack of effective medications for the treatment of AMPH addiction and other psychostimulant drugs. Recent studies have shown that the vasopressin system plays a significant role in drug addiction, making it an interesting therapeutic target. Therefore, this research aimed to investigate the effect of intranasal vasopressin (AVP) administration during the conditioned place preference (CPP) extinction phase on AMPH-induced reinstatement. Male adolescent Sprague-Dawley rats (43-45 postnatal days) were conditioned with AMPH (1.5 mg/kg i.p.) or saline for 5 days. Subsequently, during 5 days of extinction, the animals received intranasal treatment with AVP (20 µg/kg) or saline. Following the extinction phase, reinstatement was induced by an AMPH injection. Levels of glutamate, GABA, dopamine, and DOPAC were quantified in the nucleus accumbens (NAc), ventral tegmental area (VTA), prefrontal cortex (PFC), and dorsal striatum. The results suggest that intranasal AVP administration during the extinction phase partially blocks CPP reinstatement or drug-seeking behavior in male rats. This effect may be attributed to reduced activity in the NAc and PFC. Additionally, AVP may act by inhibiting glutamate release in the VTA through increased GABAergic tone of VTA interneurons.

KEYWORDS

Amphetamine, Conditioned place preference, Vasopressin, Intranasal administration, Adolescence, Reinstatement.

3. INTRODUCCIÓN

La adicción o dependencia a las drogas es un desorden crónico caracterizado por una compulsión a buscar y consumir la droga, a pesar de la aparición de problemas significativos relacionados con ella, control deficitario sobre su consumo y la manifestación de un estado emocional negativo, tal como disforia, ansiedad y/o irritabilidad, cuando no se tiene acceso a la misma (Koob & Volkow, 2016; APA, 2013).

El proceso adictivo comprende un círculo vicioso de 3 fases: (1) consumo excesivo-intoxicación, durante la cual el efecto gratificante de las drogas refuerza positivamente el consumo y se desarrolla el hábito, (2) abstinencia-afecto negativo, referido a la aparición de síntomas emocionales y físicos negativos que surgen ante el periodo de abstinencia de la droga, y (3) preocupación-anticipación (*craving*), fase en la cual se busca la droga de forma compulsiva a modo de refuerzo negativo, siendo un elemento clave de la recaída (Koob & Le Moal, 1997; Koob & Volkow, 2010).

Las drogas de abuso generan su efecto gratificante al incrementar niveles de dopamina (DA) en el núcleo accumbens (NAc), mecanismo clave del circuito de recompensa en el cerebro (Di Chiara & Imperato, 1988). El circuito de recompensa comprende principalmente el área tegmental ventral (VTA) y sus proyecciones dopaminérgicas al NAc y a PFC, y es una vía común tanto de reforzadores naturales como la comida y el sexo, como artificiales (drogas) (Wise, 1998). A su vez, el VTA recibe proyecciones de ácido γ -aminobutírico (GABA) desde NAc y proyecciones glutamatérgicas principalmente desde PFC, mientras que NAc, un núcleo principalmente GABAérgico, recibe proyecciones glutamatérgicas provenientes de PFC, y amígdala basolateral, entre otros núcleos (Cooper et al., 2017).

Cuando se produce el cese o la reducción en el consumo de la sustancia a la cual se ha desarrollado una dependencia, surge una serie de síntomas físicos y psíquicos negativos denominado síndrome de abstinencia (APA, 2013). Durante este periodo, la activación del sistema de recompensa de los ganglios basales se ve disminuida y, por su parte, aumenta la activación de los sistemas de estrés asociados a la hipófisis y la amígdala extendida, lo cual contribuye a la sintomatología ansiosa y comportamiento de búsqueda compulsiva de la droga (Koob & Volkow, 2016).

La recaída o el uso de una sustancia luego de un periodo largo de abstinencia, puede ser gatillada por estímulos asociados a la droga, la re-exposición a la droga a la cual se depende y/o estrés (Self & Nestler, 1998). En efecto, los sujetos con adicción, experimentan aumento de DA ante señales o estímulos asociados al consumo gatillando el “*craving*” o avidez que corresponde a la necesidad imperiosa y compulsiva de consumir la droga durante la etapa de abstinencia (Volkow et al., 2011). Del mismo modo, exhiben mayores índices de *craving* y ansiedad al ser expuestos a imágenes estresantes, en comparación a cuando se les expone a imágenes neutras (Sinha, 2008).

En cuanto al circuito neural que media la recaída, se ha determinado que las proyecciones dopaminérgicas mesocorticolímbicas son imprescindibles para la reinstauración de los comportamientos

de búsqueda de droga. Por su parte, las proyecciones glutamatérgicas desde PFC hacia NAc, y las proyecciones GABAérgicas desde NAc hacia pálido ventral constituyen una vía común final para el proceso de recaída, estimulando la ejecución de conductas orientadas a la búsqueda de droga, independientemente del estímulo que la desencadene (claves ambientales, estrés y/o droga) (Kalivas & Volkow, 2005).

Diversos estudios respaldan la idea de un aumento en la señalización glutamatérgica en NAc, mediada por la activación de receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), durante periodos prolongados de abstinencia y durante la conducta de búsqueda de droga (Bowers, Chen & Bonci, 2010). Recientemente, Murray y colaboradores (2019), observaron adicionalmente un aumento en la expresión de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en NAc en animales que se encontraban en un periodo de abstinencia después de ser tratados con metanfetamina. Se ha observado, sin embargo, que la re-exposición a la droga revierte este proceso, resultando en una disminución de la función de los receptores AMPA en NAc (Kourrich et al., 2007).

3.1 ADOLESCENCIA Y VULNERABILIDAD A ADICCIÓN A DROGAS

La adolescencia (10 – 20 años de edad) es una etapa del desarrollo que se caracteriza, entre otras cosas, por una mayor impulsividad, comportamientos de riesgo y búsqueda de lo novedoso, tal como la experimentación con drogas de abuso (Chambers et al., 2003). Estas características están asociadas, por un lado, a la maduración de sistemas dopaminérgicos, promovido en parte por hormonas sexuales (Chambers et al., 2003), a la maduración del sistema límbico, asociado a la regulación de las emociones (Giedd, 2015), y desarrollo de estructuras asociadas a la cognición social (Blakemore, 2008), confiriendo en los adolescentes una mayor importancia a las conductas sociales.

La impulsividad está marcada por una PFC todavía en desarrollo, la cual se asocia al control inhibitorio y al razonamiento (Giedd, 2015). Durante la adolescencia, hay una menor actividad de la PFC, explicado en parte por un proceso de reorganización y poda sináptica, luego de la excesiva sinaptogénesis durante la infancia (Blakemore, 2008). Otra explicación de la impulsividad y los comportamientos riesgosos en adolescentes, es la falta de maduración de receptores de GABA en el lóbulo frontal (Silveri et al., 2013).

Dado lo anterior, los adolescentes exhiben respuestas más gratificantes, menores respuestas aversivas ante las sustancias de abuso y sintomatología más leve durante el proceso de abstinencia. No obstante, el uso de drogas en este periodo tiene efectos más nocivos y a largo plazo a nivel neurobiológico, incrementando la probabilidad de desarrollar dependencia o adicción a drogas (Paus et al., 2008).

3.2 PSICOESTIMULANTES: ANFETAMINA (AMPH)

Dentro de las drogas de abuso, se encuentran los psicoestimulantes como la anfetamina (AMPH) y la cocaína, los cuales se caracterizan por causar excitación y euforia, y aumentar la actividad motora y

estado de alerta (Couch et al., 2020). En la actualidad, los estimulantes de tipo anfetamínicos son el segundo tipo de drogas ilícitas más ampliamente utilizados en el mundo (United Nations Office on Drugs and Crime, 2014). En el año 2019, se reportó una prevalencia global del consumo de anfetaminas del 0.5% en personas entre 15 a 64 años, siendo América del Norte la región con la mayor prevalencia, con cifras superiores al 2% (United Nations Office on Drugs and Crime, 2021).

Dentro de estas cifras, los adolescentes constituyen uno de los grupos etarios de mayor consumo de AMPHs con fines recreativos. Esta situación es preocupante debido a que estudios en modelos animales han demostrado que el uso de AMPHs en edades tempranas puede ocasionar alteraciones neurofisiológicas persistentes que aumentan el riesgo de abuso y dependencia de drogas en la adultez (Teixeira-Gomes et al., 2014). Además, se ha observado que los animales en etapa adolescente presentan una menor sensibilidad a los efectos psicomotores de las AMPHs y una mayor vulnerabilidad de deterioro cognitivo en comparación con los adultos (Teixeira-Gomes et al., 2014).

La AMPH tiene una capacidad de liberación rápida, inmediata y sumamente alta de DA, superior al ocasionado por otras drogas como cocaína, morfina y etanol, inclusive en dosis más altas (Di Chiara & Imperato, 1988). Ésta actúa bloqueando la recaptura de DA y norepinefrina (NE) por medio de la inhibición del transportador de DA (DAT) y NE (NET), a su vez, inhibe el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT-2), redistribuyendo las monoaminas desde las vesículas hacia el citosol, resultando en la liberación de DA a la sinapsis vía transporte reverso a través del DAT (Seiden et al., 1993; Faraone, 2018). Adicionalmente, la AMPH inhibe la actividad de la monoamina oxidasa (MAO), disminuyendo la degradación de las monoaminas (Miller et al., 1980).

Puesto que las AMPHs son drogas estimulantes, el síndrome por su abstinencia se caracteriza por la depresión del sistema nervioso central, lo que conlleva a la presencia de un ánimo disfórico, coloquialmente llamado *bajón* o *crash*, y puede ir acompañado de sintomatología depresiva y, en algunos casos, ideación suicida (APA, 2013).

A pesar del alto potencial de abuso de la AMPH y las altas cifras en su consumo, en especial en adolescentes, aún no existe un fármaco eficaz para el tratamiento de la dependencia a la anfetamina. Se ha probado el uso de antidepresivos como mirtazapina y amineptina, los cuales aumentan los niveles de DA y NE, antipsicóticos, y reemplazo con agonistas (Brensilver et al., 2013; Naji et al., 2022). No obstante ninguna de estas han sido totalmente efectivas y se enfocan más bien en el tratamiento parcial de algunas sintomatologías como el *craving* y la ansiedad propias del síndrome de abstinencia (Shoptaw et al., 2009). Ante la necesidad creciente de desarrollar fármacos eficaces en el tratamiento de la dependencia a drogas, surge como un prometedor blanco terapéutico, gracias a sus implicancias en procesos adictivos y trastornos neuropsiquiátricos, el sistema vasopresinérgico.

3.3 VASOPRESINA

La arginina vasopresina (AVP) es un nonapéptido tradicionalmente conocido por su rol en la regulación de la presión arterial y el equilibrio hídrico, para lo cual es sintetizada en las neuronas magnocelulares y parvocelulares del núcleo paraventricular y supraóptico del hipotálamo, y liberada desde la hipófisis posterior hacia la periferia (Stoop, 2012). Adicionalmente, la AVP cumple un rol como neuropéptido, pudiendo ser sintetizada de manera extrahipotalámica en el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) (van Leeuwen & Caffé, 1983), amígdala medial (MeA), *locus coeruleus* (Caffé & van Leeuwen, 1983), entre otros. En cuanto a sus proyecciones, la MeA proyecta hacia el septum lateral (LS), al igual que BNST, y al hipocampo ventral (Caffé et al., 1987).

En el sistema nervioso central, la AVP está implicada en la regulación de comportamientos sociales como la agresión e interacción con otros, procesos de memoria y aprendizaje, estados emocionales como ansiedad y depresión (Caldwell et al., 2008), y en procesos adictivos (Godino & Renard, 2018). La AVP puede ejercer su acción a través de receptores acoplados a proteína G: V_{1A} , V_{1B} y V_2 . El receptor V_{1A} y V_{1B} se encuentran expresados en el cerebro y vasos sanguíneos, mientras que V_2 se expresa principalmente a nivel de los túbulos renales (Stoop, 2012).

3.4 VASOPRESINA EN ADICCIÓN

La AVP tiene un efecto bidireccional en la adicción, observándose alteraciones en el sistema vasopresinérgico en el sistema nervioso central por drogas de abuso como psicoestimulantes y alcohol (Godino & Renard, 2018; Harper et al., 2018). Se ha encontrado que la administración de AMPH reduce el contenido de AVP en LS en ratas machos; y aumenta la expresión de AVP en MeA y BNST en hembras cuando se ha producido la sensibilización a la droga (Ahumada et al., 2017). A su vez, las inyecciones de cocaína de manera crónica resultan en la reducción de las concentraciones de AVP en hipotálamo, hipocampo, amígdala y prosencéfalo basal (Sarnyai et al., 1992), y generan un incremento en ARNm del receptor V_{1B} en la glándula pituitaria anterior en machos, mientras que los niveles de ARNm de AVP en amígdala y en hipotálamo permanecen estables (Zhou et al., 2005).

Se ha encontrado, a su vez, que AVP tiene un rol en la sensibilización a AMPH y cocaína. Por ejemplo, las ratas Brattelboro deficientes de AVP no desarrollan sensibilización ante administración crónica de cocaína (Post et al., 1982), y del mismo modo, el tratamiento con AVP previo a la administración de una dosis de AMPH genera una sensibilización a la droga comparable a inyecciones sucesivas de la misma (McBride et al., 2007). De forma contrapuesta, se ha observado que el tratamiento previo con AVP inhibe el incremento de la actividad locomotora inducida por AMPH y cocaína (Chiu et al., 1998). No obstante, esta contradicción puede deberse a diferencias en la metodología, por ejemplo el sitio de inyección (intraventricular versus subcutáneo), y la administración de la AVP (varias dosis sucesivas versus una dosis).

Resultados de nuestro laboratorio han evidenciado que microinyecciones de AVP en LS en machos disminuye la expresión del condicionamiento por AMPH y reduce la liberación de DA en NAc, efecto que sería mediado por la activación del receptor V_{1A} (Gárate-Pérez et al., 2021). Por otra parte, se ha encontrado que el bloqueo de receptores V_{1A} en el NAc es capaz de inhibir el condicionamiento por cocaína, mientras que la administración de un agonista del receptor V_{1A} incrementa la respuesta condicionada (Rodríguez-Borrero et al., 2010). Así, es altamente probable que el efecto de la AVP dependa del núcleo o estructura a la cual se administre, la dosis y la fase de la adicción en la cual es administrada.

En cuanto al rol de la AVP en abstinencia, se ha observado que los niveles de ARNm de AVP en amígdala y PVN aumentan durante periodos tempranos de abstinencia por consumo crónico de cocaína, al igual que el número de neuronas AVP en el PVN parvocelular y que los niveles plasmáticos de ACTH (Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2011). Esta activación del eje hipotálamo hipofisario adrenal (HPA), posterior al consumo crónico progresivo de cocaína, fue atenuada por la administración de un antagonista del receptor V_{1B} (Zhou et al., 2011). Del mismo modo, el tratamiento con un antagonista del receptor V_{1B} , por administración subcutánea en ratas macho, reduce el condicionamiento por metanfetamina en fase de extinción y recaída (Subiah et al., 2012).

3.5 ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE VASOPRESINA

En este último tiempo, múltiples estudios clínicos han demostrado efectos a nivel neuronal, comportamental y fisiológico luego de la administración intranasal de AVP (Meyer-Lindenberg et al., 2011). La ventaja de la administración intranasal radica en la facilitación del acceso de péptidos al sistema nervioso central, eludiendo la barrera hematoencefálica (Pietrowsky et al., 1996). En humanos, se ha demostrado que la administración de AVP intranasal es capaz de aumentar el contenido de AVP en el fluido cerebroespinal en un lapso de 10 minutos (Born et al., 2002). Por su parte, se ha observado en roedores una disminución en la actividad de varios núcleos, entre estos el NAc tras la administración intranasal de AVP (Galbusera et al., 2017). A razón de esta evidencia, nuestra investigación se basó en la administración vía intranasal de AVP.

A pesar de la evidencia acerca del rol de la AVP en conductas adictivas, poco es sabido acerca del rol de AVP en el proceso de abstinencia y recaída, y existe aún menor conocimiento de éste en la adicción por AMPH. Esto es algo relevante de investigar tomando en cuenta las altas tasas de consumo de AMPH, en especial en adolescentes, junto con la carencia de fármacos para el tratamiento de la adicción y la falta de eficacia en aquellos dirigidos al tratamiento del síndrome de abstinencia, fase clave en que el *craving* puede gatillar la recaída. Ante esto surge la siguiente pregunta de investigación:

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la administración intranasal de vasopresina (AVP) durante el periodo de extinción en la reinstauración del condicionamiento por amfetamina (AMPH) por re-exposición a la droga?

5. HIPÓTESIS

La administración intranasal de AVP durante el periodo de abstinencia produce un aumento en la reinstauración del condicionamiento por AMPH tras de la re-exposición a la droga, lo cual se acompaña del aumento de los niveles de DA en NAc y PFC, aumento de los niveles de GABA en área tegmental ventral (VTA) y PFC, y aumento de los niveles de glutamato en NAc y VTA.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la administración intranasal de AVP durante el proceso de extinción del condicionamiento por AMPH en la reinstauración del mismo tras la re-exposición a la droga, y estudiar el contenido de DA, GABA y glutamato en NAc, VTA, PFC y estriado dorsal (DS).

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Evaluar el efecto de la administración intranasal de AVP en la extinción y reinstauración del condicionamiento por AMPH.
- ii) Determinar el contenido de DA en NAc, VTA, PFC y DS tras el tratamiento con AVP y reexposición a AMPH.
- iii) Determinar el contenido de GABA y glutamato en NAc, VTA, PFC y DS tras el tratamiento con AVP y reexposición a AMPH.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

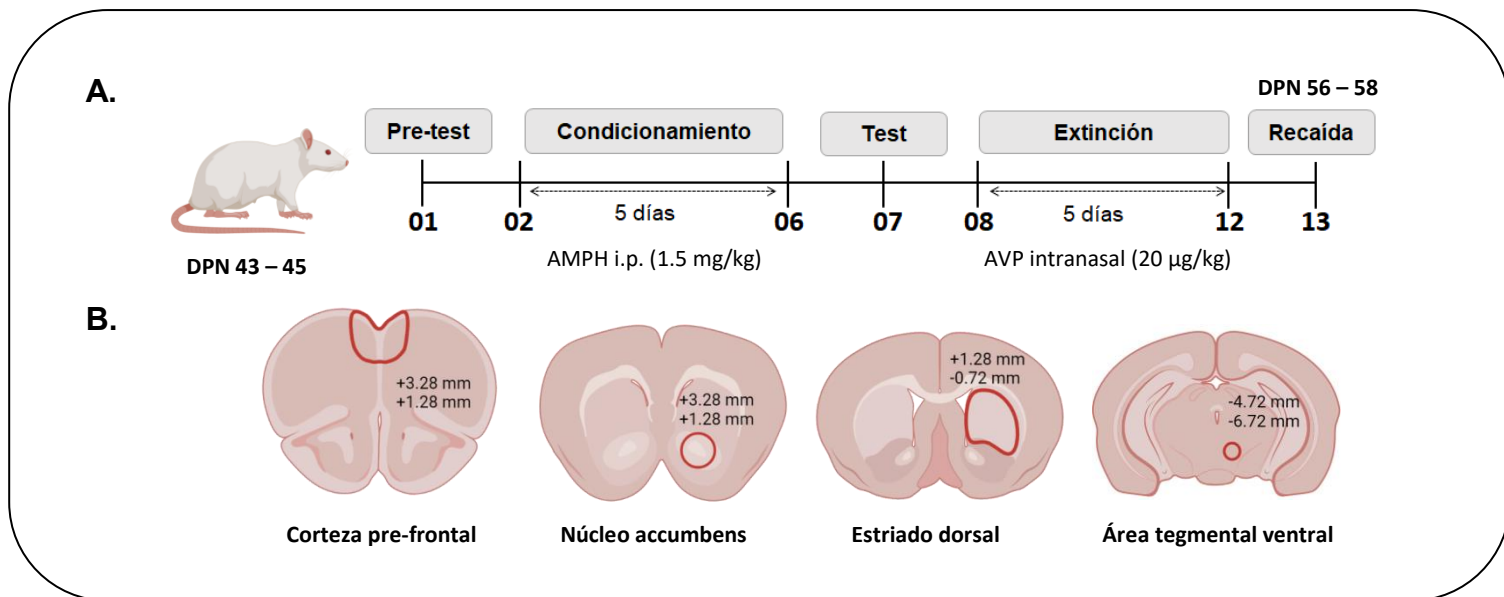


Figura 1. Diseño experimental. A. Protocolo de CPP a AMPH. CPP con fase de condicionamiento, extinción y recaída aplicado a animales de 43-45 a 56-58 DPN. **B. microdissección.** Posterior a la recaída, se realizó la microdissección de los núcleos de interés: corteza pre-frontal, núcleo accumbens, estriado dorsal y área tegmental ventral.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 REACTIVOS

Anfetamina sulfato (AMPH), donada por Laboratorios Chile SA. Arginina vasopresina (AVP), sintetizada por la Dra. Fanny Guzmán en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

8.2 ANIMALES

Se utilizaron 28 ratas macho Sprague-Dawley adolescentes (DPN 43 – 45), los cuales fueron mantenidos bajo ciclos luz-oscuridad (12: 12 horas), con una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad de $55 \pm 5\%$, y con acceso ilimitado a comida y agua. El peso, aspecto y comportamiento de los animales fue monitoreado de manera diaria durante todo el procedimiento. Adicionalmente, se utilizaron 17 ratas hembra Sprague-Dawley adolescentes (DPN 43 – 45), resultados los cuales, a razón de no ser el objetivo principal de este estudio, se presentan en anexos como figuras suplementarias. Todos los procedimientos experimentales realizados fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética Institucional de la Universidad de Santiago con número de actas: 251/2022, 383/2022 y 035/2023. Los animales fueron aleatoriamente distribuidos en 4 grupos y recibieron los siguientes tratamientos:

- **Grupo 1 (SAL-SAL):** tratado con solución salina (NaCl 0.9%; 1 ml/kg i.p.) durante el condicionamiento y el periodo de extinción (vía intranasal).
- **Grupo 2 (SAL-AVP):** solución salina (NaCl 0.9%; 1 ml/kg i.p.) durante el condicionamiento y AVP (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por vía intranasal durante el periodo de extinción.
- **Grupo 3 (AMPH-SAL):** AMPH por vía i.p. (1.5 mg/kg) durante el condicionamiento y vehículo vía intranasal durante el periodo de extinción.
- **Grupo 4 (AMPH-AVP):** AMPH (1.5 mg/kg i.p.) durante fase de condicionamiento y AVP (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por vía intranasal en extinción (Ver figura 1).

8.3 PREFERENCIA DE LUGAR CONDICIONADO (CPP)

El aparato de CPP consiste en 3 compartimientos: blanco, negro y un corredor neutro de color gris que une a ambos compartimientos. El compartimiento blanco se iluminó con 50-60 lux, el corredor neutro con 5 o menos lux, y el compartimiento negro con 1 o menos lux.

Para este estudio, se utilizó un protocolo de condicionamiento y recaída por AMPH modificado de Cruz et al. (2008). Este consiste en 4 fases: (1) Pre-test, (2) Condicionamiento por AMPH, (3) Extinción, y (4) Reinstauración del condicionamiento inducido por una dosis de AMPH.

- (1) **Pre-test:** En la fase de pre-test se determinó la línea base de preferencia de los animales en el compartimiento blanco. Los animales fueron colocados de manera individual en el compartimiento neutro con las puertas removidas para permitir el acceso y exploración libre a todo el aparato;

primero por 2 minutos a modo de familiarización e inmediatamente después se llevó a cabo el pre-test propiamente tal por 15 minutos.

- (2) **Condicionamiento:** En la fase de condicionamiento, se realizaron dos sesiones de 60 minutos, con un intervalo de 4 horas entre ellas, durante 5 días. En la sesión de la mañana, todos los grupos recibieron una inyección de solución salina (0.9%, 1ml/kg i.p.); los animales del grupo AMPH fueron confinados por 60 minutos en el compartimiento negro y el grupo salino en el compartimiento blanco. En la tarde, los animales del grupo AMPH fueron inyectados con la droga (1.5 mg/kg i.p.) y confinados en el compartimiento blanco (o de menor preferencia) por 60 minutos; y los animales control recibieron una inyección de solución salina y fueron confinados en el compartimiento negro.
- (3) **Test:** Veinticuatro horas después de la última sesión de condicionamiento, los animales fueron colocados en el compartimiento neutro y se les permitió explorar libremente el aparato por 15 minutos, en ausencia de AMPH y solución salina, con tal de evaluar el condicionamiento por AMPH asociado al compartimiento blanco.
- (4) **Extinción:** Durante la fase de extinción, los animales previamente condicionados con AMPH o SAL fueron asignados aleatoriamente para recibir tratamiento con AVP o solución salina vía intranasal durante un período de 5 días. Tras una espera de 40 minutos después de la administración, los animales fueron colocados en el aparato de exploración libre durante 15 minutos. En el último día de extinción, se llevó a cabo una prueba de CPP y se registró el tiempo de permanencia en el compartimiento asociado a la droga, como medida de la extinción del comportamiento de búsqueda de droga.
- (5) **Reinstauración:** Finalmente, veinticuatro horas después de la última sesión de extinción, se inyectó a los animales con una dosis de AMPH (1.5 mg/kg) e inmediatamente después fueron colocados en el compartimiento central con acceso a todo el aparato por 15 minutos.

El criterio de condicionamiento a la AMPH, fue definido como el aumento en un 20% o más del tiempo de permanencia en el lado blanco en la fase de test en comparación al pre-test para los animales tratados con AMPH, aquellos que no cumplieron el criterio fueron retirados del análisis para extinción de conducta y posterior recaída (11 machos y 6 hembras). La actividad de los animales fue grabada y analizada posteriormente de manera manual. Se analizó el tiempo de permanencia en segundos en el compartimiento blanco en el día del pre-test, test de condicionamiento, test de extinción y recaída.

8.4 ADMINISTRACIÓN INTRANASAL

Durante la fase de extinción, se administró vía intranasal una dosis de 20 µg/kg de AVP o vehículo (NaCl 0.9%), seleccionada en base a estudios no publicados de nuestro laboratorio. La dosis de 20 µg/kg es una

dosis media, en comparación a dosis de 50 µg/kg aprox. y 0.94 µg/kg utilizadas en estudios previos en ratones (Galbusera et al., 2017; Guoynes & Marler, 2023).

La AVP fue preparada en alícuotas de 0.25 mg/ml y almacenadas a -20°C. Las alícuotas fueron descongeladas al momento de la administración intranasal, para la cual se utilizó una pipeta de 100 µl para aplicar bilateralmente aprox. 10 µl de solución, difundiendo por el epitelio escamoso del rinario izquierdo y derecho para su captación por cada fosa nasal, evitando la aplicación directa (De acuerdo al protocolo de Lukas & Neumann, 2012). Luego de 40 minutos, los animales fueron colocados en los aparatos de CPP de manera individual para el procedimiento de extinción previamente descrito.

Con tal de minimizar el posible estrés inducido por la administración intranasal, los animales fueron manipulados durante 5 días previos al CPP. Los primeros dos días, las ratas fueron manipuladas por 5 minutos al día para familiarizarse con la experimentadora. En los siguientes días, se habituó a las ratas a ser inmovilizadas en posición supina, y los últimos dos días se administró solución salina intranasal con tal de familiarizarlas al procedimiento. Adicionalmente, los animales fueron mantenidos en pareja del mismo grupo experimental desde 5 días previos y durante todo el transcurso del experimento, con tal de evitar estrés por aislamiento.

8.5 EXTRACCIÓN DE TEJIDO

Inmediatamente después del análisis conductual, los animales fueron eutanasiados por decapitación bajo anestesia profunda, y el cerebro fue removido y seccionado, por medio de una matriz de cerebro, en cortes coronales de 2 mm. Las rebanadas con los núcleos y estructuras de interés fueron colocadas y diseccionadas en un plato frío sobre hielo a 4°C. PFC (entre +3.28 a +1.28 mm aproximadamente relativo a bregma, Paxinos & Watson, 2009), NAc (entre +3.28 a +1.28 mm relativo a bregma, Paxinos & Watson, 2009), el cual fue removido con un punch de tejido de 2 mm, DS (entre +1.28 a -0.72 mm relativo a bregma, Paxinos & Watson, 2009) y VTA (entre -4,72 a -6,72 mm relativo a bregma, Paxinos & Watson, 2009), removido con un punch de tejido de 1.5 mm, posteriormente fueron pesados en una balanza analítica. Los tejidos fueron homogeneizados en 400 µL ácido perclórico a 0,2M por medio de un sonicador de vástago, centrifugados por 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C y el sobrenadante filtrado por medio de un filtro de jeringa de politetrafluoroetileno (PTFE) con un tamaño de poro de 0,2 µm. Los filtrados fueron almacenados en -80°C para el análisis posterior de contenido de DA, DOPAC, GABA y Glutamato (GLU).

8.6 CUANTIFICACIÓN DE DOPAMINA Y DOPAC

El contenido de DA y DOPAC en NAc, VTA, PFC y DS fue determinado por medio de HPLC acoplado a detector electroquímico, el cual cuenta con una caja de interfaz (modelo LC-NetII/ADC, Jasco Corp.), una bomba cuaternaria (Modelo PU-2089s Plus, Jasco Corp., Tokio, Japón), una columna de fase C-18

(Kromasil 100-3,5, Suecia) y un detector electroquímico (Modelo ECD-700, Eicom Corp., San Diego, USA), configurado a un potencial de oxidación de 700 mV. La fase móvil contenía 0.15M de ácido cítrico monohidrato, 0.8611 mM de octilo sulfato sal sódica, 5% de CH₃CN (pH 4) y 12% de C₄H₈O, el cual es bombeado a un flujo de 0.200 mL/min. El contenido de DA y DOPAC se analizó comparando el área del pico y tiempo de elución de la muestra con estándares de referencia, y se calcularon las concentraciones a través de una curva de calibrado para cada neurotransmisor realizada con un programa cromatográfico (ChromNAV versión 2.02.05, Jasco Corp. Ltd., Tokio, Japón).

8.7 CUANTIFICACIÓN DE GABA Y GLUTAMATO

El contenido de GABA y glutamato en NAc, VTA, PFC y DS fue determinado por medio de un HPLC acoplado a detector fluorométrico. Para la lectura de las señales se realizó un proceso de derivatización, el cual consistió en una mezcla de 20 µL de la muestra con 4 µL de buffer borato (pH 10,5) y 4 µL de reactivo fluorogénico (20 mg de ortoftaldehído y 10 µL de b-mercaptoetanol en 5 mL de etanol). Luego de 90 segundos, las muestras fueron inyectadas al equipo de HPLC, el cual cuenta con bomba isocrática (modelo PU-4180, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón), una columna de 5 µm de fase reversa C-18 de 150 x 4.6 mm (Luna, Phenomenex; CA, EEUU) y un detector fluorométrico (modelo FP-4025, Jasco Co. Ltd.; Tokio, Japón). La fase móvil contiene 0,1M de NaH₂PO₄*2H₂O y 24% de CH₃CN (pH ajustado a 5,6), la cual es bombeada a un flujo de 0.800 mL/min. El tiempo de retención para glutamato es entre 2 a 4 minutos aproximadamente y para GABA es de 14 a 17 minutos aproximadamente. El contenido de GABA y GLU fue analizado comparando el área del pico y tiempo de elución de la muestra con estándares de referencia, y se calcularon las concentraciones a través de una curva de calibrado para cada neurotransmisor realizada con un programa cromatográfico (ChromNAV 2.0, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan).

8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron realizados por medio de GraphPad Prism (versión 8.0.2, GraphPad Software, San Diego, California USA), y el nivel de significancia para todos los análisis fue establecido en p = 0.05. La influencia del tratamiento y el tiempo en el peso de los animales fue determinada por medio de ANOVA de dos vías tanto para machos (Figura 2) como hembras (Figura suplementaria 1). El análisis de la preferencia de lugar condicionado fue realizado por medio de ANOVA de dos vías y el método LSD de Fisher para múltiples comparaciones entre fases del protocolo (Figura 3; Figura suplementaria 2). En cuanto al contenido o niveles de neurotransmisores y metabolitos, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar grupos de interés, destacando su utilidad en casos de muestras pequeñas y distribuciones no paramétricas (Figura 4-15).

9. RESULTADOS

9.1 PESO DE LOS ANIMALES

El peso de los animales fue monitoreado diariamente durante los 13 días de protocolo (desde 43-45 DPN hasta 56-58 DPN). El tratamiento con AMPH y/o AVP no afectó la ganancia de peso de los animales. Por medio de ANOVA de dos vía se obtuvo que el transcurso del tiempo en días tuvo un efecto significativo en la variación del peso en machos ($F_{(1.647, 14.82)} = 1026, p < 0.0001$), mientras que el tratamiento con AMPH y/o con AVP no influyó en éste ($F_{(1.977, 17.79)} = 1.868, p = 0.1837$). Asimismo, la interacción entre tratamiento y tiempo no presentó efectos sobre el peso de los animales ($F_{(2.364, 10.51)} = 1.412, p = 0.2900$) (Figura 2). Las hembras también exhibieron un efecto en la variación del peso dado por el tiempo ($F_{(1.372, 8.230)} = 224.9, p < 0.0001$), mientras que la interacción entre el tiempo y el tratamiento no tuvo influencia en el mismo ($F_{(2.232, 4.402)} = 1.012, p = 0.4446$) (Figura suplementaria 1).

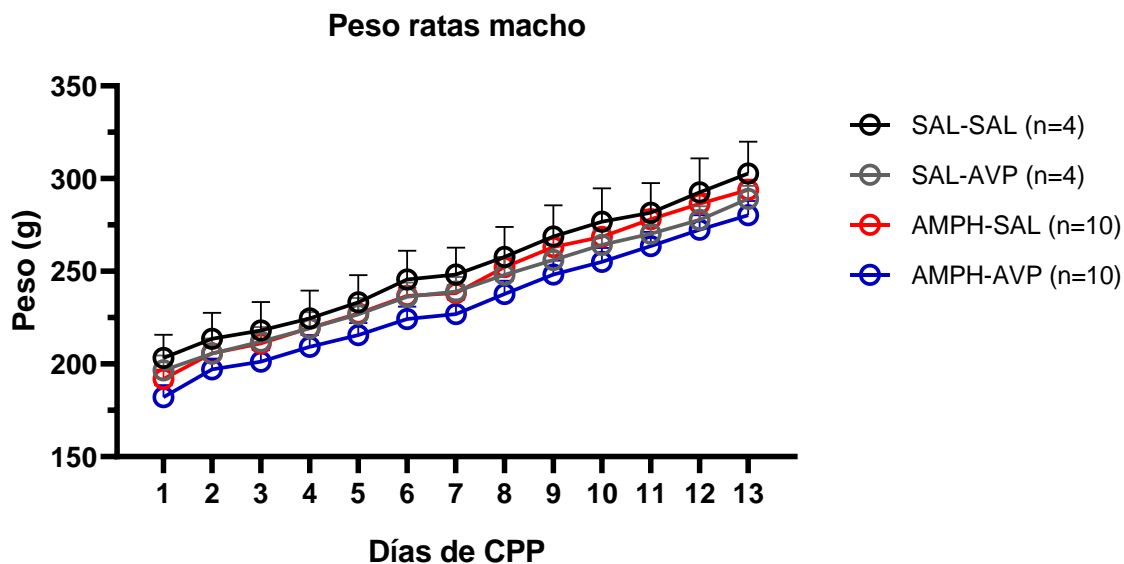


Figura 2. Peso de ratas macho durante el protocolo de preferencia de lugar condicionado (CPP). Se muestra el peso en gramos de los animales de cada grupo experimental durante los días del protocolo de preferencia de lugar condicionado. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

9.2 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE AVP EN RECAÍDA POR AMPH

Se evaluó el efecto de la administración intranasal de AVP en la reinstauración de la búsqueda de droga bajo un protocolo de preferencia de lugar condicionado por AMPH. Es importante mencionar que aquellos animales que no exhibieron expresión del condicionamiento, fueron excluidos de los análisis conductuales. ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas en función a la fase del protocolo ($F_{(3, 12)} = 8.809, p=0.0023$), y por efecto de la interacción entre la fase del protocolo y el tratamiento de cada grupo experimental ($F_{(9, 24)} = 2.796, p= 0.0214$) (Figura 3).

El método LSD de Fisher reveló diferencias significativas en tiempo de permanencia en el compartimiento asociado a AMPH (o blanco) entre el pre-test y el test en el grupo AMPH-SAL ($t_{(36)} = 2.043, p= 0.0484$) y AMPH-AVP ($t_{(36)} = 2.824, p= 0.0077$), mientras que no se apreciaron diferencias entre el pre-test y test de los animales del grupo SAL-SAL ($t_{(36)} = 1.233, p= 0.2257$) y SAL-AVP ($t_{(36)} = 0.5347, p= 0.5962$) (Figura 3). Asimismo, esta tendencia fue encontrada en hembras (Figura suplementaria 2).

En cuanto a la extinción, mediante la prueba LSD de Fisher, no se hallaron diferencias significativas entre el pre-test y la extinción en los grupos AMPH-SAL ($t_{(36)} = 0.6866, p=0.4967$) y AMPH-AVP ($t_{(36)} = 0.5185, p=0.6073$), mientras que se encontraron diferencias significativas en estos grupos entre el test y extinción ($t_{(36)} = 1.165, p=0.0097$; $t_{(36)} = 3.343, p= 0.0019$), indicando la extinción del condicionamiento por AMPH en ambos grupos (Figura 3). Por su parte, los grupos SAL-SAL y SAL-AVP presentaron diferencias significativas entre pre-test y extinción ($t_{(36)} = 2.460, p=0.0188$; $t_{(36)} = 2.398, p=0.0218$), disminuyendo el tiempo de permanencia en el lado blanco entre una fase y la otra (Figura 3). En hembras, por el contrario, no se produjo la extinción del condicionamiento por AMPH en aquellos animales tratados con AVP (Figura suplementaria 2).

Respecto a la recaída, el método LSD de Fisher reveló una diferencia significativa entre la fase de extinción y recaída en el grupo AMPH-SAL ($t_{(36)} = 3.895, p= 0.0004$), mientras que no se halló diferencia alguna en los grupos AMPH-AVP ($t_{(36)} = 1.757, p= 0.0874$), SAL-SAL ($t_{(36)} = 0.1857, p= 0.8537$) ni SAL-AVP ($t_{(36)} = 0.5797, p= 0.5657$), indicando que el tratamiento con AVP durante la extinción inhibe el comportamiento de búsqueda de droga (o recaída) inducido por una nueva dosis de la droga (Figura 3). En el caso de las hembras, aquellas tratadas con AMPH no exhibieron diferencias entre la extinción y la recaída, y entre ésta última y el pre-test (Figura suplementaria 2).

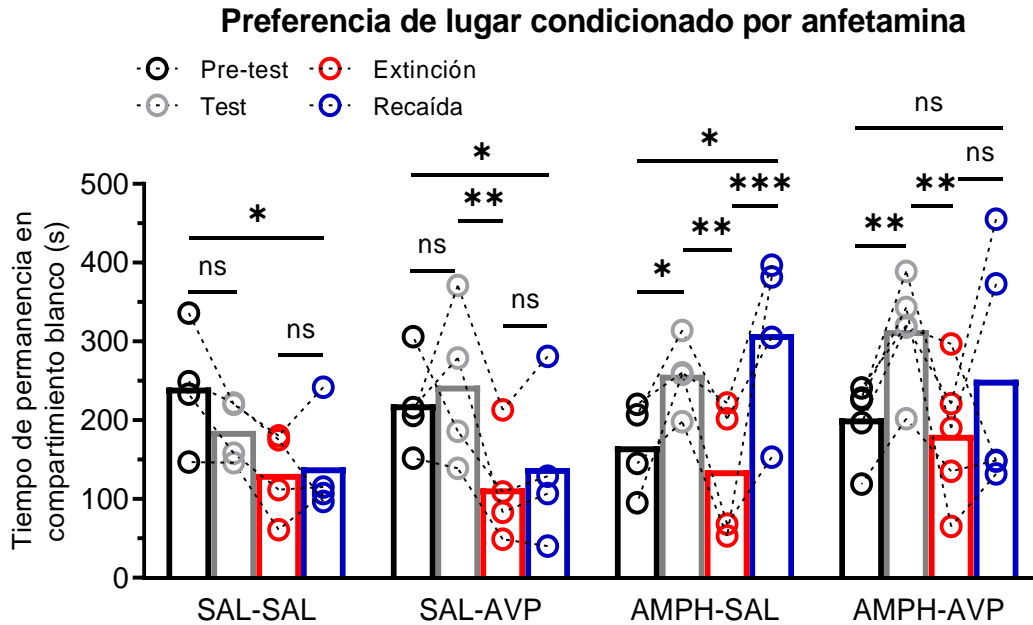


Figura 3. Efecto de la administración de vasopresina (AVP) intranasal, durante la fase de extinción del protocolo de preferencia de lugar condicionado a anfetamina (AMPH), sobre la recaída por AMPH en ratas macho. Los resultados son expresados como el tiempo promedio en segundos de permanencia en el compartimiento blanco de los grupos SAL-SAL(n=4), SAL-AVP (n=4), AMPH-SAL (n=4) y AMPH-AVP (n=5), durante el pre-test, test, extinción y recaída, \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

9.3 CONTENIDO DE NEUROTRANSMISORES Y METABOLITOS

9.3.1 CONTENIDO DE GLUTAMATO EN NÚCLEO ACCUMBENS

En cuanto al contenido de glutamato en NAc en ratas macho, por medio de la prueba U de Mann-Whitney de una cola, se encontraron diferencias entre los grupos SAL-SAL y SAL-AVP (U=1, p=0.029). No obstante, no se hallaron diferencias entre el grupo SAL-SAL y AMPH-SAL (U=4, p=0.171), SAL-AVP y AMPH-AVP (U=4, p=0.095), ni tampoco entre AMPH-SAL y AMPH-AVP (U=6, p=0.206) (Figura 4).

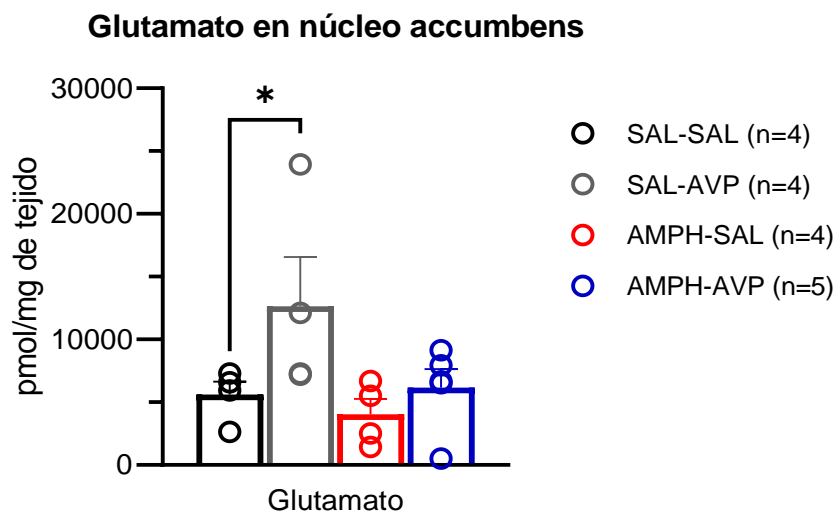


Figura 4. Contenido de glutamato en núcleo accumbens en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de glutamato en pmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM. *p<0.05.

9.3.2 CONTENIDO DE GABA EN NÚCLEO ACCUMBENS

En cuanto al contenido de GABA en NAc en ratas macho, la prueba U de Mann-Whitney no reveló diferencias significativas entre el contenido de GABA entre el grupo SAL-SAL y SAL-AVP, aunque sí una tendencia en el aumento del contenido de GABA en aquellos animales tratados con AVP ($U=2$, $p=0.057$). Tampoco se hallaron diferencias entre el grupo SAL-SAL y AMPH-SAL ($U=7$, $p=0.443$), ni entre SAL-AVP y AMPH-AVP ($U=7$, $p=0.278$), ni AMPH-SAL y AMPH-AVP ($U=4$, $p=0.095$).

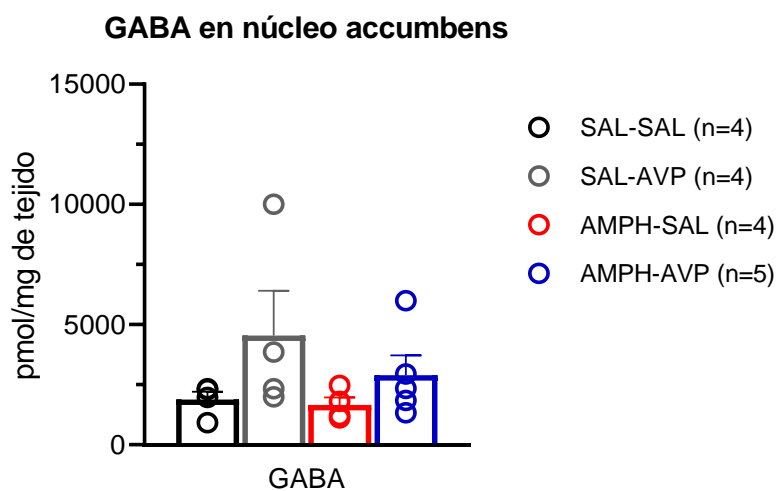


Figura 5. Contenido de GABA en núcleo accumbens en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de GABA en pmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM.

9.3.3 CONTENIDO DE DA Y DOPAC EN NÚCLEO ACCUMBENS

Al aplicar una prueba U de Mann-Whitney de una cola, no se encontraron diferencias en el contenido de DA entre el grupo SAL-SAL y SAL-AVP en NAc ($U=2$, $p=0.114$); tampoco se encontraron diferencias entre los grupos AMPH-SAL y AMPH-AVP ($U=8$, $p=0.365$), SAL-SAL y AMPH-SAL ($U=5$, $p=0.243$) ni SAL-AVP y AMPH-AVP ($U=5$, $p=0.286$). En cuanto al contenido de su metabolito, DOPAC; la prueba U de Mann-Whitney tampoco reveló diferencia significativas entre el grupo SAL-SAL y SAL-AVP ($U=6$, $p=0.571$), SAL-SAL y AMPH-SAL ($U=4$, $p=0.171$), SAL-AVP y AMPH-AVP ($U=5$, $p=0.286$), ni entre AMPH-SAL y AMPH-AVP ($U=8$, $p=0.365$). Previamente, se identificó un valor atípico en el grupo SAL-AVP, el cual fue retirado del análisis.

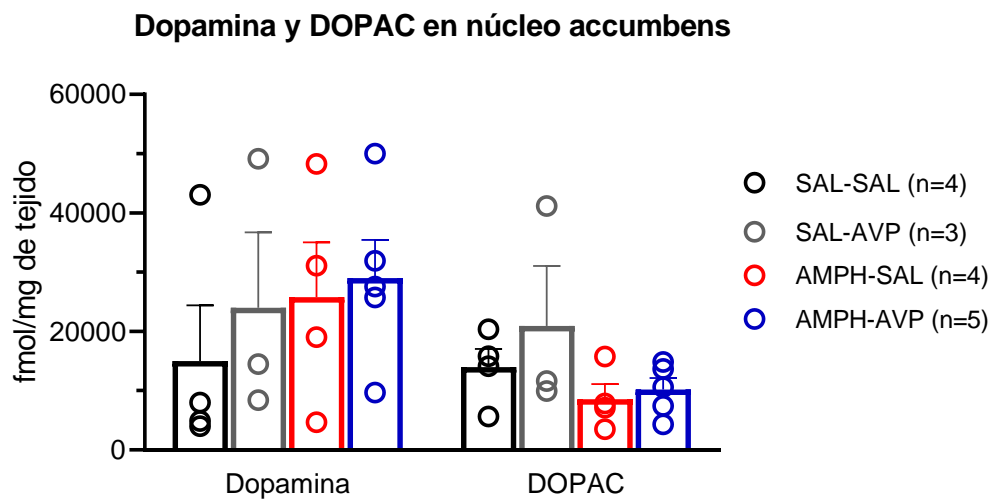


Figura 6. Contenido de dopamina y DOPAC en NAc en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de dopamina y DOPAC en fmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM. * $p<0.05$.

9.3.4 CONTENIDO DE GLUTAMATO EN ÁREA TEGMENTAL VENTRAL

La prueba U de Mann-Whitney de una cola, reveló diferencias estadísticas significativas en el contenido de glutamato en VTA en el grupo AMPH-SAL y AMPH-AVP (U=2, p=0.032) y una tendencia de la AMPH de reducir el contenido de glutamato al comparar SAL-SAL y AMPH-SAL (U=2, p=0.057). No se hallaron diferencias entre los grupos SAL-SAL y SAL-AVP (U=5, p=0.243) ni entre SAL-AVP y AMPH-AVP (U=5, p=0.143).

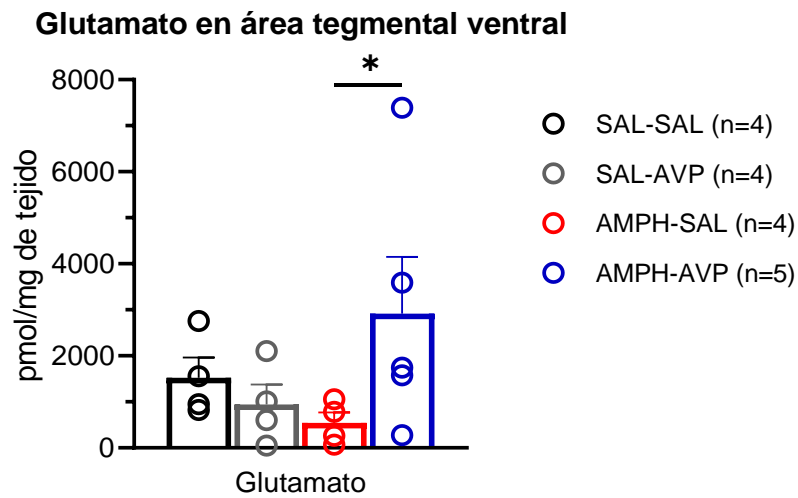


Figura 7. Contenido de glutamato en área tegmental ventral en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de glutamato en pmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM. *p<0.05.

9.3.5 CONTENIDO DE GABA EN ÁREA TEGMENTAL VENTRAL

La prueba de U de Mann-Whitney de una cola, reveló diferencias significativas en el contenido de GABA en VTA entre los grupos AMPH-SAL y AMPH-AVP (U=1, p=0.016). Asimismo, se halló que el contenido de GABA de aquellos animales del grupo AMPH-SAL disminuye significativamente en comparación a los SAL-SAL (U=1, p=0.029). No se hallaron diferencias entre el grupo SAL-SAL y SAL-AVP (U=6, p=0.343) ni entre SAL-AVP y AMPH-AVP (U=6, p=0.206).

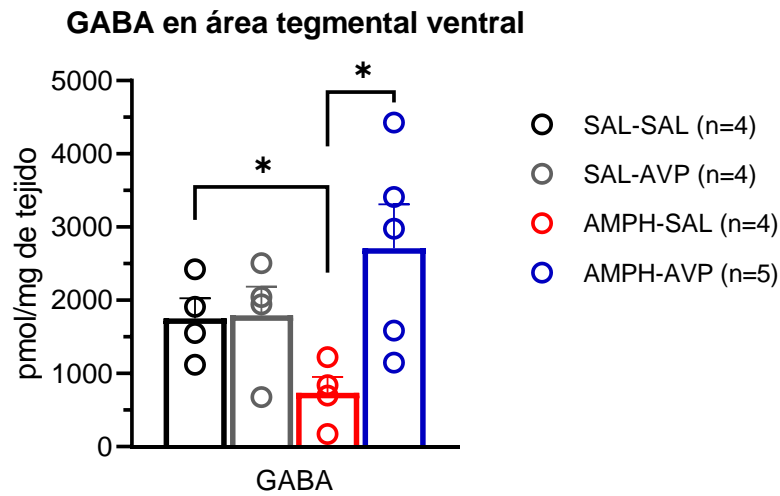


Figura 8. Contenido de GABA en área tegmental ventral en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de GABA en pmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM. *p<0.05.

9.3.6 CONTENIDO DE DA Y DOPAC EN ÁREA TEGMENTAL VENTRAL

Por medio de una prueba U de Mann-Whitney de una cola, no se hallaron diferencias en el contenido de DA en VTA entre los grupos SAL-SAL y SAL-AVP ($U=6$, $p=0.343$), entre SAL-SAL y AMPH-SAL ($U=4$, $p=0.171$), ni entre SAL-AVP y AMPH-AVP ($U=9$, $p=0.452$), tampoco se hallaron entre AMPH-SAL y AMPH-AVP ($U=6$, $p=0.206$). Por su parte, el contenido de DOPAC en animales tratados con anfetamina tiende a reducir en VTA en comparación a los animales tratados con solución salina ($U=2$, $p=0.057$). No se halló diferencia en el contenido de DOPAC entre el grupo SAL-SAL y SAL-AVP ($U=6$, $p=0.343$), SAL-AVP y AMPH-AVP ($U=6$, $p=0.206$), ni entre AMPH-SAL y AMPH-AVP ($U=9$, $p=0.452$).

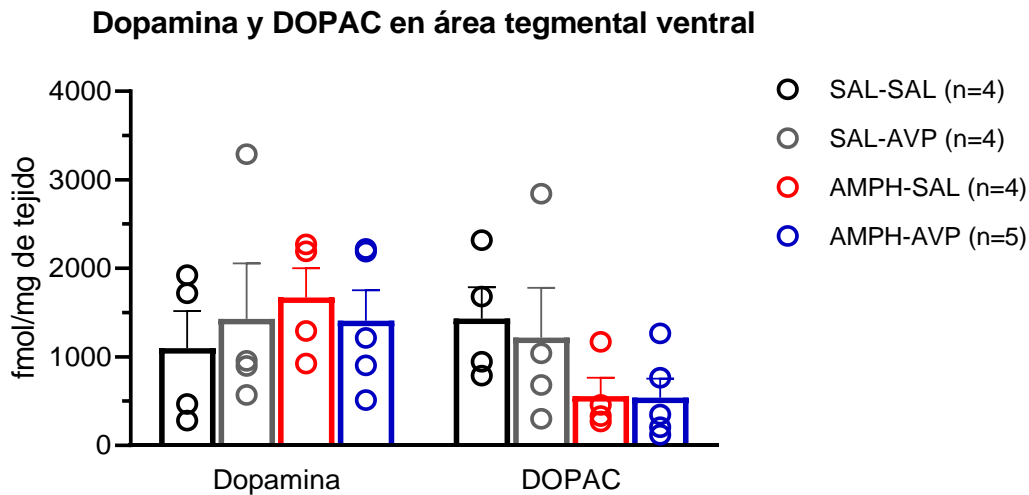


Figura 9. Contenido de dopamina y DOPAC en área tegmental ventral en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de dopamina y DOPAC en fmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM.

9.3.7 CONTENIDO DE GLUTAMATO EN CORTEZA PRE-FRONTAL

Se comparó el contenido de glutamato en PFC por medio de la prueba U de Mann-Whitney de una cola. Si bien la diferencia no fue estadísticamente significativa, se halló que el grupo SAL-AVP presenta una tendencia a mayores niveles de glutamato en comparación con el grupo SAL-SAL ($U=2$, $p=0.057$) y en comparación al grupo AMPH-AVP ($U=3$, $p=0.056$). No se hallaron diferencias significativas entre el grupo SAL-SAL y AMPH-SAL ($U=7$, $p=0.443$), ni tampoco entre AMPH-SAL y AMPH-AVP ($U=6$, $p=0.206$).

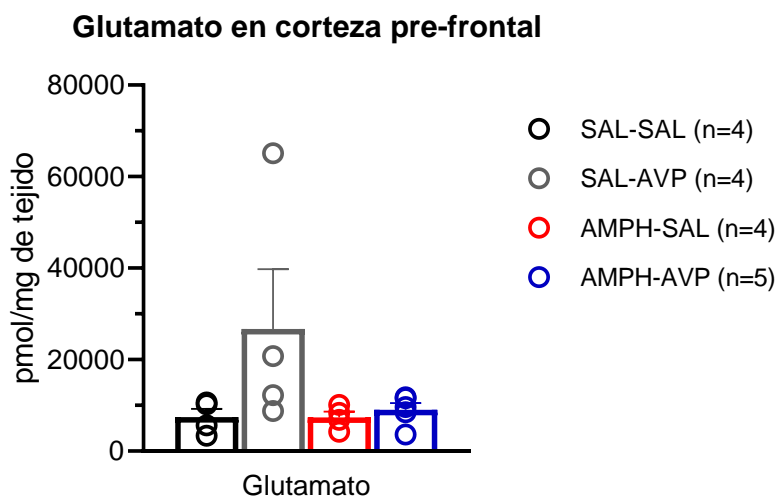


Figura 10. Contenido de glutamato en corteza pre-frontal en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de glutamato en pmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM.

9.3.8 CONTENIDO DE GABA EN CORTEZA PRE-FRONTAL

En cuanto al contenido de GABA en PFC, la prueba U de Mann-Whitney de una cola no reveló diferencias en los grupos SAL-SAL y SAL-AVP ($U=3$, $p=0.100$), SAL-SAL y SAL-AMPH ($U=6$, $p=0.343$), SAL-AVP y AMPH-AVP ($U=8$, $p=0.365$), ni tampoco entre AMPH-SAL y AMPH-AVP ($U=8$, $p=0.365$).

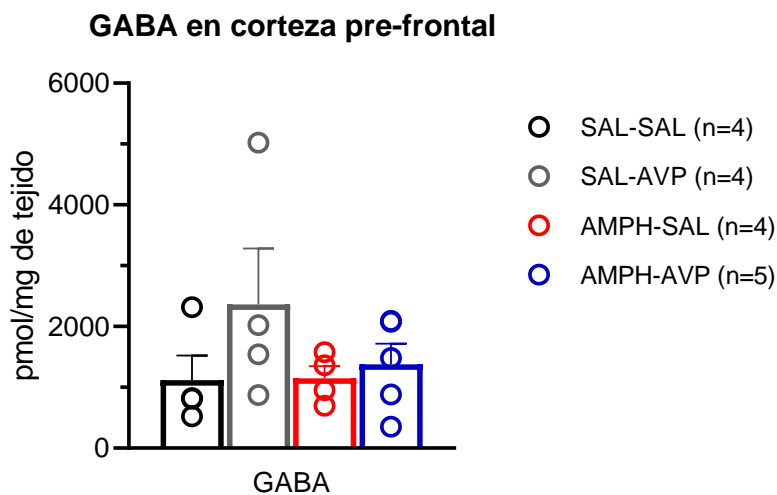


Figura 11. Contenido de GABA en corteza pre-frontal en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de GABA en pmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM.

9.3.9 CONTENIDO DE DA Y DOPAC EN CORTEZA PRE-FRONTAL

La prueba U de Mann-Whitney de una cola, reveló diferencias significativas en el contenido de DA en PFC entre el grupo SAL-SAL y AMPH-SAL ($U=1$, $p=0.029$). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos SAL-SAL y SAL-AVP ($U=4$, $p=0.171$), SAL-AVP y AMPH-AVP ($U=6$, $p=0.393$), ni entre AMPH-SAL y AMPH-AVP ($U=10$, $p=0.548$). En cuanto al contenido de DOPAC, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos SAL-SAL y SAL-AVP ($U=3$, $p=0.100$), SAL-SAL y AMPH-SAL ($U=5$, $p=0.243$), SAL-AVP y AMPH-AVP ($U=3$, $p=0.125$), ni tampoco entre AMPH-SAL y AMPH-AVP ($U=8$, $p=0.365$). Previamente, se identificó un valor atípico en el grupo SAL-AVP, el cual fue retirado del análisis.

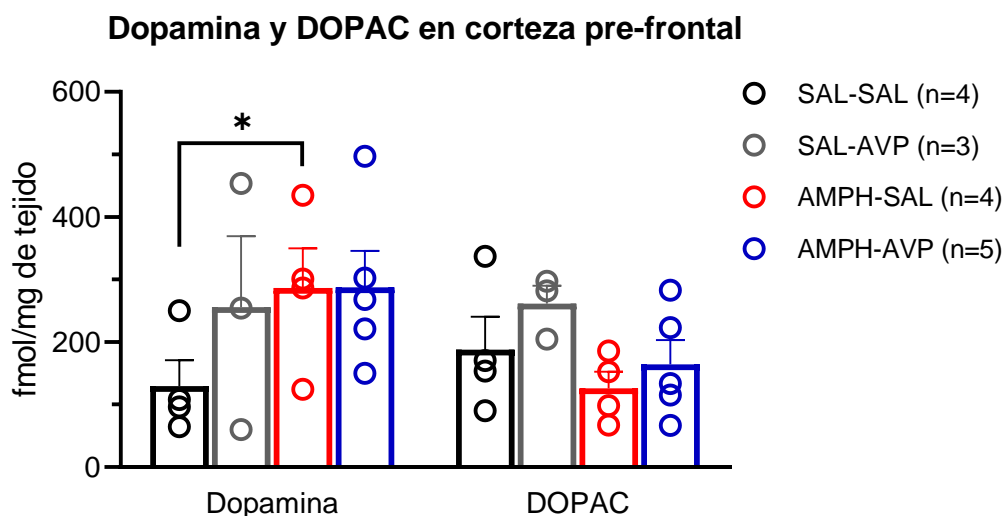


Figura 12. Contenido de dopamina y DOPAC en PFC en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de glutamato en fmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM. * $p<0.05$.

9.3.10 CONTENIDO DE GLUTAMATO EN ESTRIADO DORSAL

En cuanto al contenido de glutamato en DS, la prueba U de Mann-Whitney no reveló diferencias entre los grupos SAL-SAL y SAL-AVP ($U=4$, $p=0.171$), SAL-SAL y AMPH-SAL ($U=7$, $p=0.443$), SAL-AVP y AMPH-AVP ($U=5$, $p=0.143$), ni AMPH-SAL y AMPH-AVP ($U=6$, $p=0.206$).

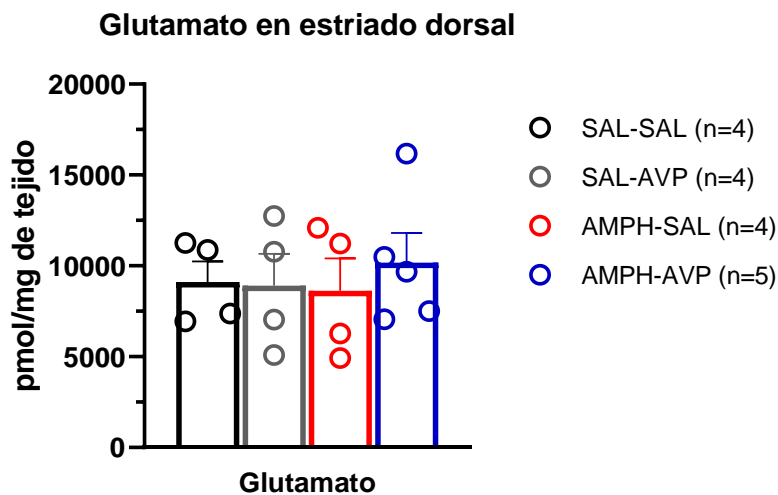


Figura 13. Contenido de glutamato en estriado en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de glutamato en pmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM.

9.3.11 CONTENIDO DE GABA EN ESTRIADO DORSAL

Por medio de la prueba U de Mann-Whitney se halló una diferencia significativa en el contenido de GABA en DS entre los grupos SAL-AVP y AMPH-AVP ($U=2$, $p=0.032$), y adicionalmente se halló que el grupo AMPH-AVP presenta una tendencia a mayores niveles de GABA en comparación con AMPH-SAL ($U=3$, $p=0.056$). No obstante, no se hallaron diferencias significativas en el contenido de GABA en DS entre SAL-SAL y SAL-AVP ($U=4$, $p=0.171$), ni entre SAL-SAL y AMPH-SAL ($U=8$, $p=0.557$).

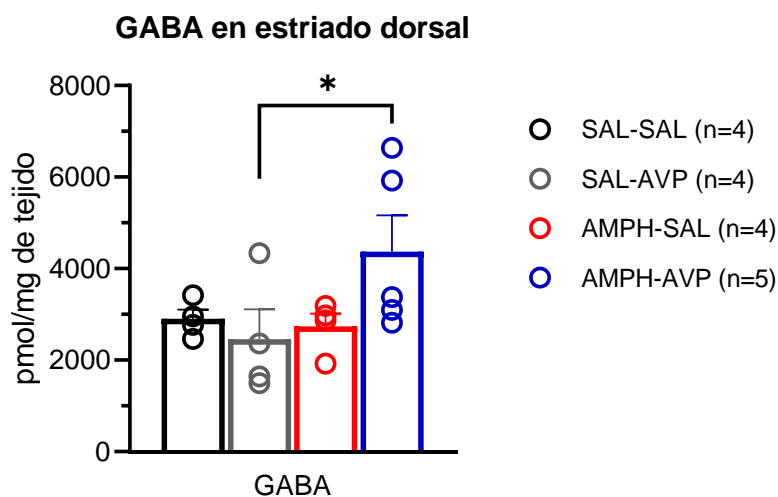


Figura 14. Contenido de GABA en estriado en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de GABA en pmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM.

9.3.12 CONTENIDO DE DA Y DOPAC EN ESTRIADO DORSAL

La prueba U de Mann-Whitney no reveló diferencias significativas en el contenido de DA en DS entre el grupo SAL-SAL y SAL-AVP (U=4, p=0.171), SAL-SAL y AMPH-SAL (U=5, p=0.243), SAL-AVP y AMPH-AVP (U=8, p=0.365), ni tampoco entre AMPH-SAL y AMPH-AVP (U=9, p=0.452). En cuanto al contenido de DOPAC en DS, tampoco se hallaron diferencias entre los grupos SAL-SAL y SAL-AVP (U=7, p=0.443), SAL-SAL y AMPH-SAL (U=7, p=0.443), SAL-AVP y AMPH-AVP (U=10, p=0.548), ni AMPH-SAL y AMPH-AVP (U=7, p=0.278).

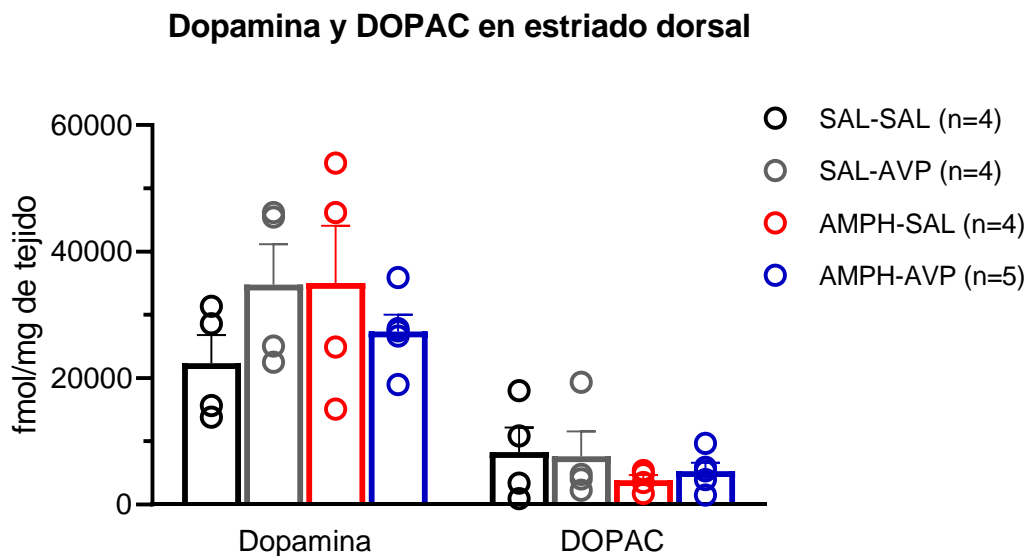


Figura 15. Contenido de dopamina y DOPAC en cuerpo estriado en ratas macho. Los resultados son presentados como el contenido promedio de GABA en fmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM.

10. DISCUSION

El presente estudio evaluó el efecto de la administración de AVP por vía intranasal en la reinstauración de la búsqueda de drogas, por medio de un protocolo de preferencia de lugar condicionado por AMPH con fase de extinción y recaída.

10.1 EFECTOS DE AVP SOBRE CONDUCTA DE RECAIDA A ANFETAMINA

Se observó que alrededor de la mitad de animales tratados con AMPH exhibieron un aumento del tiempo de permanencia en el compartimiento asociado a la droga, indicando un comportamiento de búsqueda de la droga y demostrando el poder recompensante de la misma, en concordancia con estudios previos (Gárate-Pérez et al., 2021).

En contraste, todos aquellos animales tratados con solución salina no exhibieron conductas de búsqueda de droga, indicando que el vehículo no cuenta con propiedades recompensantes. Por su parte, en animales controles la administración vía intranasal, ya sea de AVP o solución salina, no generó cambios significativos en la conducta de los mismos ni tampoco en la variación de su peso, indicando que la administración intranasal no tuvo efectos ansiogénicos ni tampoco influyó en la preferencia de los animales controles. Esto concuerda con estudios previos, en los cuales se ha hallado que la AVP, administrada de manera sistémica, no produce un efecto recompensante ni aversivo en el paradigma de CPP (Ramos et al., 2015).

De manera más relevante, se halló que una única administración de AMPH, luego de la extinción del comportamiento de búsqueda de droga en animales condicionados a AMPH, fue suficiente para reinstaurar este comportamiento. Por su parte, a diferencia de lo esperado, la administración de AVP de manera intranasal, durante 5 días de extinción, inhibió parcialmente el comportamiento de búsqueda de drogas en ratas macho. Este resultado contradice la hipótesis planteada, sugiriendo que la influencia de la AVP intranasal en el proceso de reinstauración del condicionamiento por AMPH es más compleja de lo previsto inicialmente.

En concordancia con estos resultados, se ha observado un bloqueo de la expresión del condicionamiento a AMPH y disminución de los niveles extracelulares de DA en NAc, tras una microinyección de AVP en LS (Gárate-Pérez et al., 2021). Datos similares se han observado en nuestro laboratorio tras una microinyección de AVP en CA3 de hipocampo (datos no publicados). Asimismo, se ha visto que la administración de AVP vía subcutánea inhibe el incremento de la actividad locomotora inducida por AMPH y cocaína en ratas macho (Chiu et al., 1998). En conjunto, estos hallazgos respaldan el papel modulador de la AVP en el comportamiento de búsqueda de droga y sugieren su potencial como un objetivo terapéutico en el tratamiento de la adicción.

10.2 EFECTOS NEUROQUÍMICOS

El análisis neuroquímico reveló que la administración intranasal de AVP durante el proceso de extinción del condicionamiento tuvo un efecto significativo en los niveles de glutamato y GABA en NAc y PFC. Se observó un aumento en el contenido tisular de glutamato y una tendencia al aumento en el contenido de GABA en el NAc, así como un aumento en el contenido de glutamato en el PFC. Este efecto de la AVP intranasal sobre el contenido de neurotransmisores puede estar relacionado con su capacidad sostenida de disminuir la actividad de NAc, PFC y otras estructuras relevantes en el circuito de recompensa (Galbusera et al., 2017), lo que pudiese traducirse en una menor liberación y mayores niveles intracelulares de neurotransmisores en las estructuras mencionadas. En concordancia, se ha observado que la aplicación de un antagonista selectivo de los receptores V_{1A} , a tejidos de la corteza fronto-parietal, aumenta la liberación de glutamato (Currás-Collazo et al., 2003), sugiriendo que la AVP pudiese estar disminuyendo la liberación de glutamato desde PFC y elevando los niveles intracelulares del mismo.

De manera adicional, previamente se ha observado que la aplicación de AVP en rebanadas de hipocampo facilita la transmisión GABAérgicas de las interneuronas de CA1, por medio de la activación del receptor V_{1A} (Ramanathan et al., 2012). Esto sugiere una menor transmisión glutamatérgica desde hipocampo hacia NAc, lo que pudiese repercutir en una menor transmisión GABAérgica desde este último y concuerda con los elevados niveles de GABA encontrados en NAc de animales tratados con AVP.

Por otra parte, dentro de las posibilidades, es plausible que AVP pueda ejercer un efecto sobre la síntesis de neurotransmisores. En estudios previos, se ha observado que después de la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de lisina-AVP (LVP), se produjo un aumento en la conversión de [3 H]Tirosina a [3 H] DA en la corteza frontal in vitro. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que LVP desempeñe un papel en la síntesis de DA, según lo sugerido por Delanoy y colaboradores en 1982. Si bien nuestros resultados no exhiben diferencias significativas en los niveles de contenido de DA en PFC entre los grupos tratados con AVP, es posible que esto se deba a nuestro tamaño de muestra utilizado en la investigación. Por consiguiente, resulta imperativo llevar a cabo investigaciones con el propósito de estudiar posibilidad de que AVP pueda desempeñar un papel en la síntesis de neurotransmisores.

El tratamiento con AMPH, por su parte, reveló una tendencia a reducir el contenido de DOPAC (principal metabolito de DA en roedores) en VTA, lo cual podría indicar una menor cantidad de DA disponible para su degradación y una mayor liberación de DA desde el mismo. En concordancia, el nivel de GABA en VTA disminuyó significativamente luego de la administración de AMPH, al compararse con el grupo control, mientras que el contenido de DA se vio aumentado significativamente en PFC. Estos resultados están en acuerdo con estudios previos, los cuales indican que el uso de psicoestimulantes de tipo anfetamínico generan disminución en la actividad inhibitoria de las neuronas GABAérgicas en VTA y consecuentemente, aumento en la activación de las neuronas dopaminérgicas en el mismo núcleo (Jiao et al., 2015).

A su vez, el tratamiento con AMPH tendió a reducir el contenido de glutamato en VTA, al compararlo con animales del grupo control. Las drogas de abuso pueden inducir una potenciación transitoria de las proyecciones glutamatérgicas hacia la neuronas dopaminérgicas del VTA (Bowers, Chen & Bonci, 2010). Asimismo, las drogas psicoestimulantes como la cocaína también son capaces de estimular la liberación de glutamato, a través de la estimulación indirecta de los receptores D1, en el VTA de aquellos animales con previa experiencia con la droga (Kalivas & Duffy, 1995; Kalivas & Duffy, 1998; You et al., 2007). Por lo tanto, es posible que la administración de AMPH, luego de un período de abstinencia agudo, haya generado una mayor liberación de glutamato y una disminución de los niveles intracelulares de glutamato en el VTA. Es importante destacar que, en nuestro estudio, los niveles de glutamato en PFC no mostraron cambios con el tratamiento de AMPH. Estos resultados sugieren una especificidad regional en los efectos del AMPH sobre el contenido de glutamato, con un impacto selectivo en el VTA en lugar del PFC.

De acuerdo a los resultados conductuales, los cuales mostraron una disminución en los comportamientos de búsqueda de drogas inducida por la AVP, se esperaba observar una reducción en el contenido de DA en NAc y DS, así como un aumento en el contenido de DA en VTA. Sin embargo, no se encontró efecto alguno de la AVP sobre el contenido de DA en los animales tratados con AMPH. Lo anterior sugiere que el mecanismo subyacente al efecto de AVP intranasal no estaría relacionado con la DA en VTA y NAc.

De manera notable, se observó que la administración intranasal de AVP en animales condicionados a AMPH resultó en un aumento significativo del contenido tisular de glutamato y GABA en VTA, así como una tendencia al aumento del contenido de GABA en DS. Gárate-Pérez y colaboradores en 2021, demostró que la administración de AVP intra LS, en animales condicionados a AMPH, reduce la liberación de DA desde VTA. Se ha sugerido que este efecto pudiese atribuirse a una disminución en el tono GABAérgico de las neuronas de proyección del LS hacia el VTA, y la consecuente potenciación de la activación de interneuronas GABAérgicas del VTA (Gárate-Pérez et al., 2021; Vega-Quiroga, Yarur & Gysling, 2018; Omelchenko & Sesack, 2009).

Dado lo anterior, es plausible postular que la alta concentración de GABA en VTA, como se ha observado en los animales expuestos a AMPH y AVP intranasal, puede ser atribuible a la acumulación de GABA en los terminales sinápticos de las neuronas de LS. Esta acumulación de GABA podría ser el resultado de la influencia de la AVP administrada intranasalmente sobre las neuronas de proyección de LS hacia VTA, lo que provocaría una inhibición en la liberación de GABA y su consiguiente almacenamiento en dichos terminales sinápticos. También se plantea la posibilidad de que GABA provenga de los terminales sinápticos de NAc, el cual se encontraría aparentemente con una actividad disminuida por la administración de AVP intranasal. Adicionalmente, los elevados niveles de glutamato en VTA, sugieren que parte de los efectos de la AVP en la reinstauración de CPP podrían deberse a su capacidad de inhibir

la liberación de glutamato en VTA, posiblemente a través de un aumento del tono GABAérgico de las interneuronas. Sin embargo, estas observaciones son insuficientes para proporcionar una explicación de este fenómeno, lo cual destaca la necesidad de llevar a cabo estudios adicionales para obtener una comprensión más precisa de los mecanismos.

En conjunto estos hallazgos sugieren que la administración de AVP podría ser una estrategia terapéutica para la adicción a drogas psicoestimulantes. No obstante, es necesario realizar más investigaciones para comprender mejor los mecanismos neurobiológicos subyacentes a los efectos de AVP en la reinstauración de la búsqueda de drogas, evaluar su efecto en hembras y explorar su potencial aplicación clínica de AVP en la prevención y tratamiento de la adicción a psicoestimulantes.

11. CONCLUSIONES

En conclusión, la administración intranasal de AVP, durante el período de extinción, tiene la capacidad de inhibir parcialmente la reinstauración del comportamiento de búsqueda de drogas en ratas previamente condicionadas a AMPH. A nivel neuroquímico, la administración intranasal de AVP sugiere una disminución en la transmisión GABAérgica y glutamatérgica en NAc y PFC respectivamente. Asimismo, se sugiere que AVP podría genera un aumento en el tono GABAérgico de las interneuronas de VTA.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada, C., Bahamondes, C., Cerda, C. A., Silva, R. A., Cruz, G., Moya, P. R., ... & Renard, G. M. (2017). Amphetamine treatment affects the extra-hypothalamic vasopressinergic system in a sex-and nucleus-dependent manner. *Journal of Neuroendocrinology*, 29(4). DOI: 10.1111/jne.12465
- American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th edition (DSM-5)*. Arlington, USA: American Psychiatric Publishing.
- Brensilver, M., Heinzerling, K. G., & Shoptaw, S. (2013). Pharmacotherapy of amphetamine-type stimulant dependence: an update. *Drug and alcohol review*, 32(5), 449–460. DOI:10.1111/dar.12048
- Blakemore S. J. (2008). The social brain in adolescence. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(4), 267–277. DOI: 10.1038/nrn2353
- Born, J., Lange, T., Kern, W., McGregor, G. P., Bickel, U., & Fehm, H. L. (2002). Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nature neuroscience*, 5(6), 514–516. DOI: 10.1038/nn849
- Bowers, M. S., Chen, B. T., & Bonci, A. (2010). AMPA receptor synaptic plasticity induced by psychostimulants: the past, present, and therapeutic future. *Neuron*, 67(1), 11–24. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.06.004
- Caffé, A.R., & van Leeuwen, F.W. (1983). Vasopressin-immunoreactive cells in the dorsomedial hypothalamic region, medial amygdaloid nucleus and locus coeruleus of the rat. *Cell Tissue Res*. 233, 23–33. DOI: 10.1007/BF00222229
- Caffé, A.R., van Leeuwen, F.W., & Luiten, P.G. (1987). Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 261, 237–252.
- Caldwell, H. K., Lee, H. J., Macbeth, A. H., & Young III, W. S. (2008). Vasopressin: behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Progress in neurobiology*, 84(1), 1-24.
- Chambers, R. A., Taylor, J. R., & Potenza, M. N. (2003). Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *The American journal of psychiatry*, 160(6), 1041–1052. DOI:10.1176/appi.ajp.160.6.1041
- Chiu, J., Kalant, H., & Lê, D. (1998). Vasopressin opposes locomotor stimulation by ethanol, cocaine and amphetamine in mice. *European journal of pharmacology*, 355(1), 11–17. DOI: 10.1016/s0014-2999(98)00465-8
- Cooper, S., Robison, A., & Mazei-Robison, M. (2017). Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics*, 14(3), 687–697. DOI: 10.1007/s13311-017-0525-z
- Couch, G. A., White, M. P., & de Gray, L. E. (2020). Central nervous system stimulants: basic pharmacology and relevance to anaesthesia and critical care. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 21(10), 503-511.
- Cruz, F., Marin, M., & Planeta, C.(2008). The reinstatement of amphetamine-induced place preference is long-lasting and related to decreased expression of AMPA receptors in the nucleus Acumbens. *Neuroscience*, 151(2), 313-319. DOI:10.1016/j.neuroscience.2007.10.019
- Currás-Collazo, M. C., Gillard, E. R., Jin, J., & Pandika, J. (2003). Vasopressin and oxytocin decrease excitatory amino acid release in adult rat supraoptic nucleus. *Journal of neuroendocrinology*, 15(2), 182–190. DOI: 10.1046/j.1365-2826.2003.00976.x

- Delanoy, R. L., Kramarcy, N. R., & Dunn, A. J. (1982). ACTH 1-24 and lysine vasopressin selectively activate dopamine synthesis in frontal cortex. *Brain research*, 231(1), 117–129. DOI: 10.1016/0006-8993(82)90012-9
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14), 5274–5278. DOI: 10.1073/pnas.85.14.5274
- Faraone S. V. (2018). The pharmacology of amphetamine and methylphenidate: Relevance to the neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder and other psychiatric comorbidities. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 87, 255–270. DOI:10.1016/j.neubiorev.2018.02.001
- Galbusera, A., De Felice, A., Girardi, S., Bassetto, G., Maschietto, M., Nishimori, K., Chini, B., Papaleo, F., Vassanelli, S., & Gozzi, A. (2017). Intranasal Oxytocin and Vasopressin Modulate Divergent Brainwide Functional Substrates. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(7), 1420–1434. DOI:10.1038/npp.2016.283
- Gárate-Pérez, M. F., Méndez, A., Bahamondes, C., Sanhueza, C., Guzmán, F., Reyes-Parada, M., ... & Renard, G. M. (2021). Vasopressin in the lateral septum decreases conditioned place preference to amphetamine and nucleus Acumbens dopamine release. *Addiction biology*, 26(1), e12851.
- Giedd J. N. (2015). The amazing teen brain. *Scientific American*, 312(6), 32–37. DOI: 10.1038/scientificamerican0615-32
- Godino, A., & Renard, G. M. (2018). Effects of alcohol and psychostimulants on the vasopressin system: behavioural implications. *Journal of neuroendocrinology*, 30(8), e12611.
- Guoynes, C. D., & Marler, C. A. (2023). Acute intranasal oxytocin dose enhances social preference for parents over peers in male but not female peri-adolescent California mice (*Peromyscus californicus*). *General and comparative endocrinology*, 335, 114230. DOI: 10.1016/j.ygcen.2023.114230
- Harper, K. M., Knapp, D. J., Criswell, H. E., & Breese, G. R. (2018). Vasopressin and alcohol: a multifaceted relationship. *Psychopharmacology*, 235(12), 3363–3379.
- Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) (2020). Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) Results. Seattle, United States. Available from <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>.
- Jiao, D., Liu, Y., Li, X., Liu, J., & Zhao, M. (2015). The role of the GABA system in amphetamine-type stimulant use disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 162. DOI: 10.3389/fncel.2015.00162
- Kalivas, P. W., & Duffy, P. (1995). D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(7.2), 5379–5388. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.15-07-05379.1995
- Kalivas, P. W., & Duffy, P. (1998). Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area. *Journal of neurochemistry*, 70(4), 1497–1502. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.70041497.x
- Kalivas, P. W., & Volkow, N. D. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *The American journal of psychiatry*, 162(8), 1403–1413. DOI: 10.1176/appi.ajp.162.8.1403

- Koob, G. F., & Moal, M. L. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278(5335), 52-58. DOI: 10.1126/science.278.5335.52
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760-773.
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-238. DOI: 10.1038/npp.2009.110
- Kourrich, S., Rothwell, P. E., Klug, J. R., & Thomas, M. J. (2007). Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(30), 7921-7928. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1859-07.2007
- McBride, S., & Flynn, F. (2007). Centrally administered vasopressin cross-sensitizes rats to amphetamine and drinking hypertonic NaCl. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 293(3), R1452-R1458. DOI: 10.1152/ajpregu.00048.2007
- Meyer-Lindenberg, A., Domes, G., Kirsch, P., & Heinrichs, M. (2011). Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(9), 524-538. DOI:10.1038/nrn3044
- Miller, H., Shore, P., & Clarke, D. (1980). In vivo monoamine oxidase inhibition by d-amphetamine. *Biochemical pharmacology*, 29(10), 1347-1354. DOI:10.1016/0006-2952(80)90429-3
- Murray, C. H., Loweth, J. A., Milovanovic, M., Stefanik, M. T., Caccamise, A. J., Dolubizno, H., Funke, J. R., Foster Olive, M., & Wolf, M. E. (2019). AMPA receptor and metabotropic glutamate receptor 1 adaptations in the nucleus accumbens core during incubation of methamphetamine craving. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(9), 1534-1541. DOI: 10.1038/s41386-019-0425-5
- Naji, L., Dennis, B., Rosic, T., Wiercioch, W., Paul, J., Worster, A., Thabane, L., & Samaan, Z. (2022). Mirtazapine for the treatment of amphetamine and methamphetamine use disorder: A systematic review and meta-analysis. *Drug and alcohol dependence*, 232, 109295. DOI:10.1016/j.drugalcdep.2022.109295
- Omelchenko, N., Bell, R., & Sesack, S. R. (2009). Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *The European journal of neuroscience*, 30(7), 1239-1250. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.06924.x
- Parker, K., Oztan, O., Libove, R., Mohsin, N., Karhson, D., Sumiyoshi, R., Summers, J., Hinman, K., Motonaga, K., Phillips, J., Carson, D., Fung, L., Garner, J., & Hardan, A. (2019). A randomized placebo-controlled pilot trial shows that intranasal vasopressin improves social deficits in children with autism. *Science translational medicine*, 11(491), eaau7356. DOI:10.1126/scitranslmed.aau7356
- Paus, T., Keshavan, M., & Giedd, J. N. (2008). Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence?. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(12), 947-957. DOI:10.1038/nrn2513
- Paxinos, G., & Watson, C. (2009). *The rat brain in stereotaxic coordinates: compact sixth edition*. New York: Academic Press.
- Pietrowsky, R., Strüben, C., Mölle, M., Fehm, H. L., & Born, J. (1996). Brain potential changes after intranasal vs. intravenous administration of vasopressin: evidence for a direct nose-brain

- pathway for peptide effects in humans. *Biological psychiatry*, 39(5), 332–340. DOI:10.1016/0006-3223(95)00180-8
- Post, R., Contel, N., & Gold, P. (1982). Impaired behavioral sensitization to cocaine in vasopressin deficient rats. *Life sciences*, 31(24), 2745–2750. DOI:10.1016/0024-3205(82)90720-2
- Ramanathan, G., Cilz, N. I., Kurada, L., Hu, B., Wang, X., & Lei, S. (2012). Vasopressin facilitates GABAergic transmission in rat hippocampus via activation of V(1A) receptors. *Neuropharmacology*, 63(7), 1218–1226. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.043
- Ramos, L., Hicks, C., Caminer, A., Goodwin, J., & McGregor, I. S. (2015). Oxytocin and MDMA ('Ecstasy') enhance social reward in rats. *Psychopharmacology*, 232(14), 2631–2641. DOI: 10.1007/s00213-015-3899-9
- Rodríguez-Borrero, E., Rivera-Escalera, F., Candelas, F., Montalvo, J., Muñoz-Miranda, W., Walker, J., & Maldonado-Vlaar, C. (2010). Arginine vasopressin gene expression changes within the nucleus Acumbens during environment elicited cocaine-conditioned response in rats. *Neuropharmacology*, 58(1), 88–101. DOI:10.1016/j.neuropharm.2009.06.040
- Sarnyai, Z., Szabó, G., Kovács, G. L., & Telegdy, G. (1992). Opposite actions of oxytocin and vasopressin in the development of cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 43(2), 491-494.
- Seiden, L. S., Sabol, K. E., & Ricaurte, G. A. (1993). Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 33(1), 639-676.
- Self, D., & Nestler, E. (1998). Relapse to drug-seeking: neural and molecular mechanisms. *Drug and alcohol dependence*, 51(1-2), 49–60. DOI:10.1016/S0376-8716(98)00065-9
- Shoptaw, S., Kao, U., Heinzerling, K., & Ling, W. (2009). Treatment for amphetamine withdrawal. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2009(2). DOI:10.1002/14651858.CD003021.pub2
- Silveri, M. M., Sneider, J. T., Crowley, D. J., Covell, M. J., Acharya, D., Rosso, I. M., & Jensen, J. E. (2013). Frontal lobe γ -aminobutyric acid levels during adolescence: associations with impulsivity and response inhibition. *Biological psychiatry*, 74(4), 296–304. DOI:10.1016/j.biopsych.2013.01.033
- Sinha R. (2008). Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1141, 105–130. DOI:10.1196/annals.1441.030
- Subiah, C. O., Mabandla, M. V., Phulukdaree, A., Chuturgoon, A. A., & Daniels, W. M. (2012). The effects of vasopressin and oxytocin on methamphetamine-induced place preference behaviour in rats. *Metabolic brain disease*, 27(3), 341-350.
- Stoop R. (2012). Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron*, 76(1), 142–159. DOI:10.1016/j.neuron.2012.09.025
- Teixeira-Gomes, A., Costa, V. M., Feio-Azevedo, R., Bastos, M., Carvalho, F., & Capela, J. P. (2015). The neurotoxicity of amphetamines during the adolescent period. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 41, 44–62. DOI:10.1016/j.ijdevneu.2014.12.001
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). (2021). *World Drug Report 2021*. Austria: United Nations publication.

- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2014). *Estimulantes de tipo anfetamínico en América Latina*.
- Van Leeuwen, F., & Caffé, A.R. (1983). Vasopressin-immunoreactive cell bodies in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Cell Tissue Res.* 228, 525–534.
- Vega-Quiroga, I., Yarur, H. E., & Gysling, K. (2018). Lateral septum stimulation disinhibits dopaminergic neurons in the antero-ventral region of the ventral tegmental area: Role of GABA-A alpha 1 receptors. *Neuropharmacology*, 128, 76–85. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.09.034
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Tomasi, D., & Telang, F. (2011). Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15037-15042.
- Wise, R. A. (1998). Drug-activation of brain reward pathways. *Drug and alcohol dependence*, 51(1-2), 13-22.
- You, Z. B., Wang, B., Zitzman, D., Azari, S., & Wise, R. A. (2007). A role for conditioned ventral tegmental glutamate release in cocaine seeking. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(39), 10546–10555. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2967-07.2007
- Zhou, Y., Bendor, J. T., Yuferov, V., Schlussman, S. D., Ho, A., & Kreek, M. J. (2005). Amygdalar vasopressin mRNA increases in acute cocaine withdrawal: evidence for opioid receptor modulation. *Neuroscience*, 134(4), 1391-1397.
- Zhou, Y., Litvin, Y., Piras, A. P., Pfaff, D. W., & Kreek, M. J. (2011). Persistent increase in hypothalamic arginine vasopressin gene expression during protracted withdrawal from chronic escalating-dose cocaine in rodents. *Neuropsychopharmacology*, 36(10), 2062-2075.

13. ANEXOS

13.1 RESULTADOS CONDUCTUALES Y NEUROQUÍMICOS EN HEMBRAS

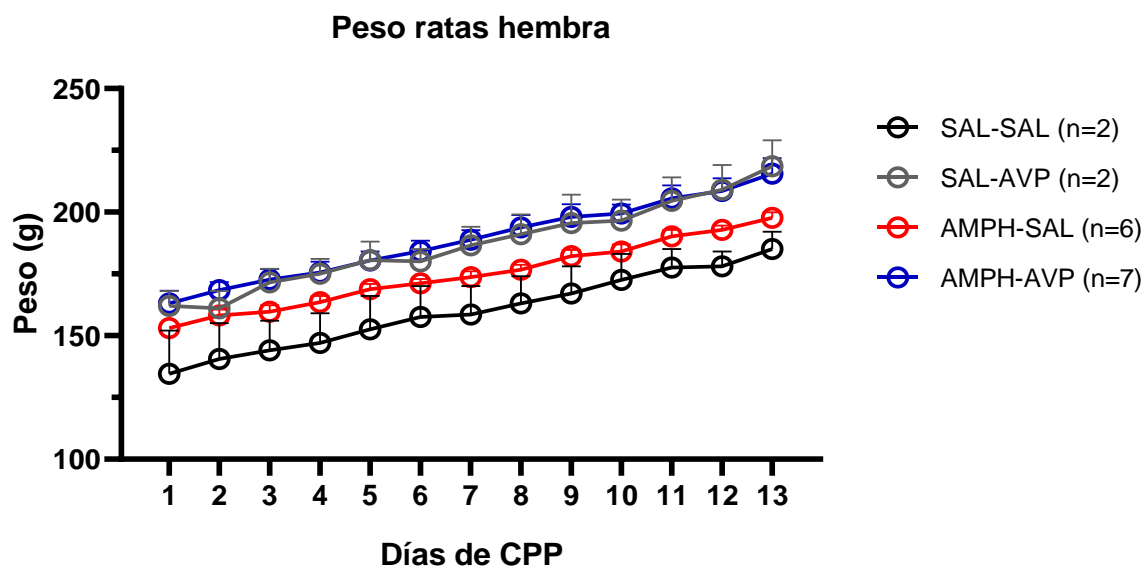


Figura suplementaria 1. Peso de ratas hembra durante el protocolo de preferencia de lugar condicionado (CPP). Se muestra el peso en gramos de los animales de cada grupo experimental durante los días del protocolo de preferencia de lugar condicionado. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

Preferencia de lugar condicionado por amfetamina en hembras

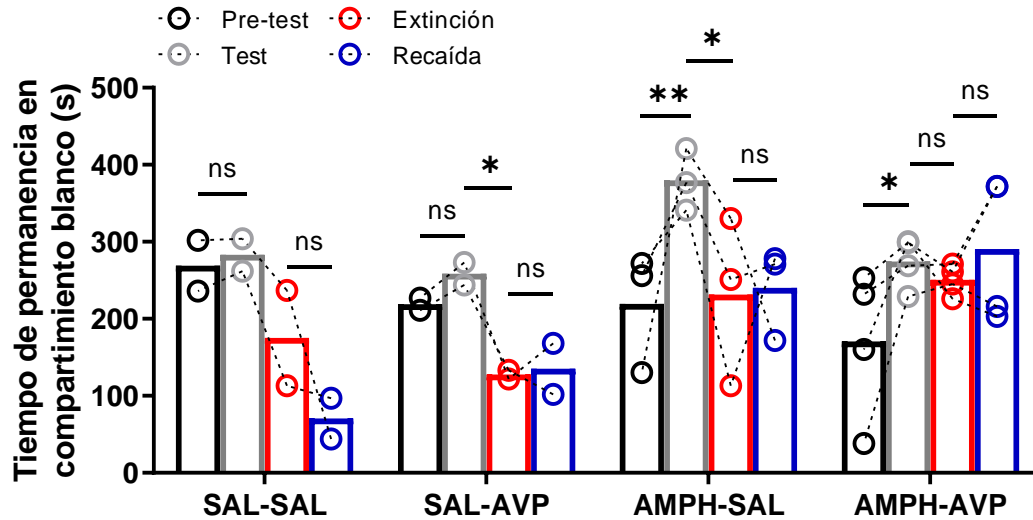


Figura suplementaria 2. Efecto de la administración de vasopresina intranasal, durante la fase de extinción del protocolo de preferencia de lugar condicionado a amfetamina (AMPH), sobre la recaída por AMPH en ratas hembra. ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de la interacción entre la fase del protocolo y el tratamiento en el tiempo de permanencia en el lado blanco ($F_{(9,7)} = 5.880$, $p = 0.0146$). El método LSD de Fisher reveló que las hembras tratadas con AMPH presentaron una expresión del condicionamiento significativa al compararse el pre-test y test (AMPH-SAL: $t_{(16)} = 3.149$, $p = 0.0062$; AMPH-AVP: $t_{(16)} = 2.443$, $p = 0.0266$). Al compararse el test con la extinción, con tal de determinar el resultado de ésta última; se hallaron diferencias significativas en el grupo AMPH-SAL ($t_{(16)} = 3.050$, $p = 0.0076$), mas no en el grupo AMPH-AVP ($t_{(16)} = 0.5546$, $p = 0.5868$), lo cual sugiere que la vasopresina bloquearía la extinción del comportamiento de búsqueda de droga en hembras. La comparación entre extinción y recaída sugiere que en hembras, la dosis de AMPH fallaría en reinstaurar el comportamiento de búsqueda de droga en el paradigma de preferencia de lugar condicionado. Los resultados son expresados como el tiempo promedio en segundos de permanencia en el compartimiento blanco de los grupos SAL-SAL ($n=2$), SAL-AVP ($n=2$), AMPH-SAL ($n=3$) y AMPH-AVP ($n=4$), durante el pre-test, test, extinción y recaída, \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

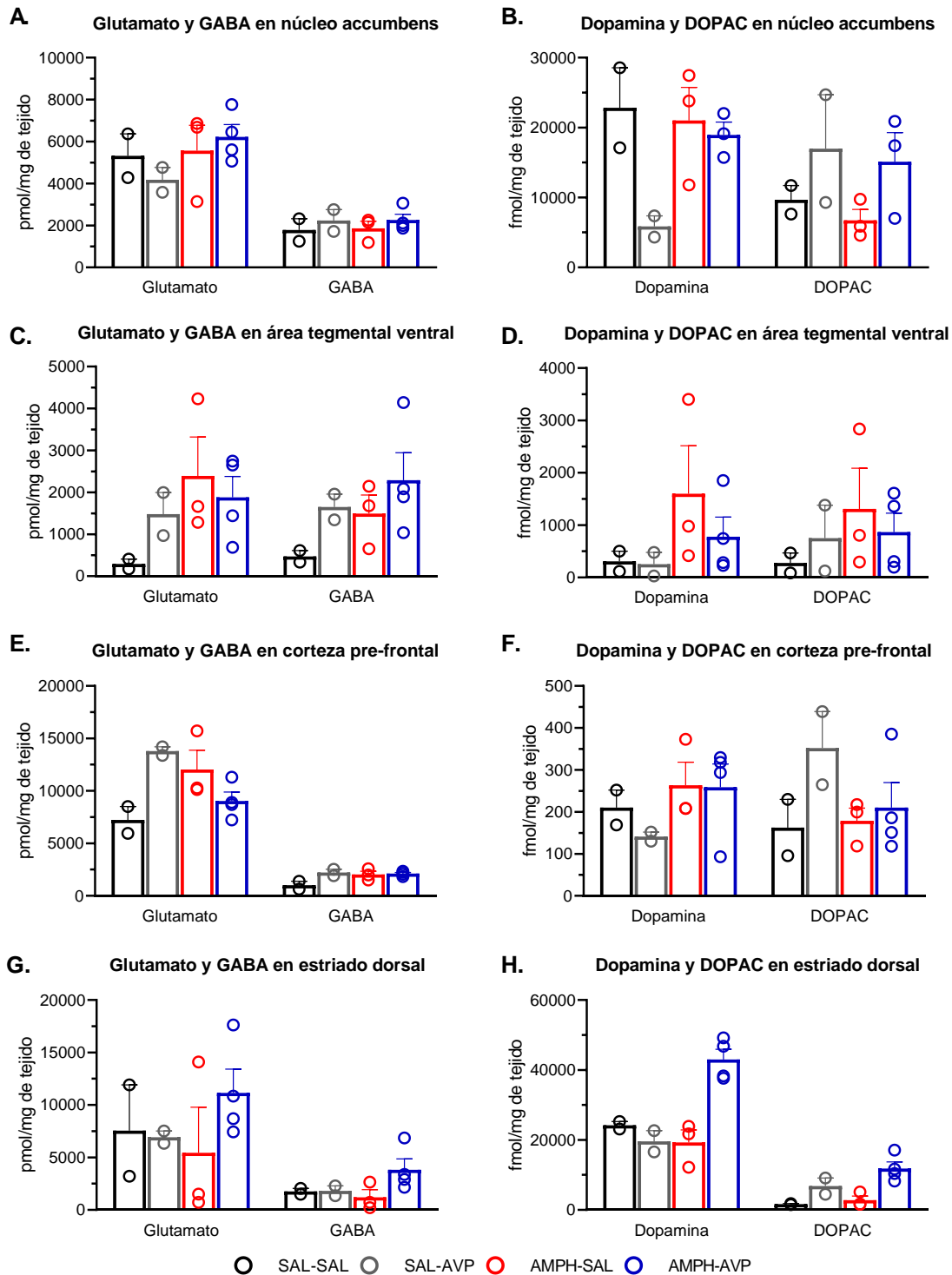


Figura suplementaria 3. Contenido de neurotransmisores y metabolitos en ratas hembras. A. Contenido de glutamato y GABA en núcleo accumbens en hembras. B. Contenido de dopamina y DOPAC en núcleo accumbens en hembras. C. Contenido de glutamato y GABA en área tegmental ventral en hembras. D. Contenido de dopamina y DOPAC en área tegmental ventral en hembras. E. Contenido de glutamato y

GABA en corteza pre-frontal en hembras. F. Contenido de dopamina y DOPAC en corteza pre-frontal en hembras. G. Contenido de glutamato y GABA en estriado dorsal en hembras. H. Contenido de dopamina y DOPAC en estriado dorsal en hembras. Los resultados son presentados como el contenido promedio de glutamato en pmol/mg de tejido de cada grupo experimental \pm SEM.



Dra. Georgina Renard
Andrea Fuentes
Escuela de Medicina
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad de Santiago de Chile
Presente



Estimada Dra. Georgina Renard

Junto con saludar, se hace llegar a usted el presente informe emitido por el Área de Ciencias de Animales de experimentación del Comité de Ética Científico Institucional:

I. IDENTIFICACIÓN

TÍTULO DEL PROYECTO:	" ROL DE LA VASOPRESINA EN LA RECAÍDA POR ANFETAMINA EN RATAS ADOLESCENTES SPRAGUE-DAWLEY"
TIPO DE PROYECTO:	Tesis de Magister en Neurociencias Fuentes de financiamiento: DICYT Regular 022101RSSA
INVESTIGADOR/A RESPONSABLE:	Dra. Georgina Renard Andrea Fuentes
ALUMNA TESISTA	
LABORATORIO/ UNIDAD ACADÉMICA:	Centro de Investigaciones Biomédicas y Aplicadas (CIBAP).
DEPARTAMENTO:	Departamento de Biología
FACULTAD:	Ciencias Médicas
CORREO ELECTRÓNICO:	georgina.renard@usach.cl

II. DOCUMENTOS TENIDOS A LA VISTA PARA LA EMISIÓN DE ESTE INFORME:

- Protocolo de Cuidado y Manejo de animales de experimentación y Supervisión de animales
- Proyecto de Tesis de Magíster. Universidad de Valparaíso
- Compromiso del Investigador responsable
- Compromiso de confidencialidad

III. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

Los adolescentes representan uno de los grupos etarios de mayor consumo de anfetamina (AMPH) como uso recreacional, conllevando a un mayor riesgo de abuso y dependencia de drogas. Esto representa un serio y preocupante problema de salud pública, no obstante, en la actualidad no existen fármacos efectivos para el tratamiento para adicción a drogas. Se ha demostrado que el sistema vasopresinérgico tiene un rol importante en el proceso de adicción a drogas, adquiriendo gran interés como blanco terapéutico. La presente investigación propone estudiar la influencia de la administración de vasopresina (AVP) en el proceso de extinción (o abstinencia) sobre la recaída tras la re-exposición a AMPH. El estudio pretende proporcionar un sustento para la formulación



de fármacos eficaces para el tratamiento de pacientes con adicción con los que se espera reducir el sufrimiento y mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias.



Objetivo general

Determinar el efecto de la administración intranasal de vasopresina durante el proceso de extinción del condicionamiento por AMPH en la reinstauración del mismo tras la reexposición a la droga.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la administración intranasal de vasopresina, durante el proceso de extinción, en la extinción y reinstauración del condicionamiento por anfetamina.
2. Determinar el contenido de DA en Núcleo Accumbens y Área Tegmental Ventral tras el tratamiento con vasopresina y reexposición a anfetamina.
3. Determinar el contenido de GABA y glutamato en Núcleo Accumbens y Área Tegmental Ventral tras el tratamiento con vasopresina y reexposición a anfetamina.

IV. ANÁLISIS BIOÉTICO

Los antecedentes del proyecto de Tesis de Magíster en Neurociencias de la Universidad de Valparaíso de la Srta. Andrea Fuentes donde el Investigador responsable es la Dra. Georgina Renrad, se analizaron por el Área de Coordinación de Ciencias Biológicas de Animales de Experimentación de nuestro Comité, no presentándose observaciones que impidan el desarrollo del Proyecto.

Para este propósito se utilizarán un total de 48 **ratas machos** cepa *Sprague Dawley*, machos y hembras, **Animales reproducidos en la Sala de mantención CIBAP.**

V. CONCLUSIONES

En conclusión, el Área de Ciencias de Animales de experimentación del Comité de Ética Institucional, ha recibido y analizado el Proyecto de Tesis de Magister titulado: “ **Rol de la vasopresina en la recaída por anfetamina en ratas adolescentes Sprague- Dawley**”, considerando los principios de las tres R (Russell y Burch, 1959), la **Ley 20.380 Sobre protección de Animales, en su Título IV, De los experimentos en animales vivos, Artículos 6°, 7°, 8°, 9° y 10°** y del análisis realizado por este Comité, mediante la presente se informa a la Dra. Georgina Renard y a la Srta. Andrea Fuentes que su proyecto se encuentra **APROBADO hasta marzo de 2023.**

Téngase presente que el Comité Ético Científico de la USACH está re-acreditado por la SEREMI de Salud RM mediante Resolución Exenta N°011494 de fecha 13 octubre 2020, y este informe aprobatorio tiene vigencia por el tiempo que dure el proyecto. Cabe señalar que cualquier modificación ocurrida en la metodología en el transcurso de la ejecución del proyecto debe ser informada oportunamente al Comité de Ética Institucional.



Saludan atentamente,

MV Carolina Marchant C.

Coordinadora Alternativa Área de Ciencias de
Animales de Experimentación
Comité de Ética Institucional



Dr. Pedro Orihuela

Coordinador Área de Ciencias de
Animales de Experimentación
Comité de Ética Institucional

Distribución

- 1.- Dra. Georgina Renard - Facultad de Ciencias Médicas
- 2.- Archivo Comité de Ética-



Dra. Georgina M. Renard
Centro de Investigaciones Biomédicas y Aplicadas
Escuela de Medicina
Universidad de Santiago de Chile
Presente



Estimada Dra. Renard,

Se hace llegar a usted el presente informe emitido por el Área de Ciencias Químicas, Medio Ambiente y Bioseguridad del Comité de Ética Institucional, en relación con:

I. IDENTIFICACIÓN

TÍTULO DEL PROYECTO:	“ROL DE LA VASOPRESINA EN LA RECAÍDA POR ANFETAMINA EN RATAS ADOLESCENTES SPRAGUE-DAWLEY”
TIPO DE PROYECTO:	Tesis para obtener el título de Magister en Neurociencias.
INVESTIGADORA RESPONSABLE:	Dra. Georgina Renard
CO-INVESTIGADORA RESPONSABLE:	Srta. Andrea Fuentes
LABORATORIO/ UNIDAD ACADÉMICA:	Centro de Investigaciones Biomédicas y Aplicadas (CIBAP). Escuela de Medicina
CORREO ELECTRÓNICO:	Georgina.renard@usach.cl

II. DOCUMENTOS TENIDOS A LA VISTA PARA LA EMISIÓN DE ESTE INFORME:

- Proyecto Tesis de Magister Andrea Fuentes
- Protocolo de Recepción de Proyectos de Bioseguridad.
- Resolución ISP 2015
- Resolución Exe 4749 del 10/10/2017
- Carta compromiso Confidencialidad y No divulgación Equipo de Investigación
- Carta compromiso Confidencialidad y No divulgación Tutora de la Tesis Investigadora a cargo.
- Fichas de seguridad
- Hoja registro sulfato de anfetamina



III. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

Antecedentes

La propuesta formulada corresponde a una tesis de Magister en Neurociencia y el equipo de investigación tutora-estudiante toma en consideración que los adolescentes representan uno de los grupos etarios de mayor consumo de anfetamina (AMPH) como uso recreacional, conllevando a un mayor riesgo de abuso y dependencia de drogas. Esto representa un serio y preocupante problema de salud pública, no obstante, en la actualidad no existen fármacos efectivos para el tratamiento para adicción a drogas. Se ha demostrado que el sistema vasopresinérgico tiene un rol importante en el proceso de adicción a drogas, adquiriendo gran interés como blanco terapéutico. A razón de lo anterior, la presente investigación propone estudiar la influencia de la administración de vasopresina (AVP) en el proceso de extinción (o abstinencia) en la recaída tras la re-exposición a AMPH. Se llevará a cabo una prueba de condicionamiento de preferencia de lugar (CPP) por AMPH, para la cual se utilizarán ratas macho Sprague-Dawley adolescentes (DPN = 43 – 45). Estos serán tratados de manera inicial con AMPH (1,5 mg/kg i.p.) o NaCl (0,9%, 1 ml/kg i.p.) por 5 días para el proceso de condicionamiento. En el periodo de extinción, en la cual los animales estarán en abstinencia de la droga, la mitad de los animales de cada grupo experimental será tratado con AVP intranasal por 5 días. Posteriormente, los animales serán re-expuestos a AMPH para el proceso de reinstauración del condicionamiento. Finalmente, se cuantificarán los niveles de dopamina, glutamato y GABA en Núcleo Accumbens y Área Tegmental Ventral, núcleos clave en el circuito de recompensa.

Objetivo general

Determinar el efecto de la administración intranasal de vasopresina durante el proceso de extinción del condicionamiento por AMPH en la reinstauración del mismo tras la reexposición a la droga.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la administración intranasal de vasopresina, durante el proceso de extinción, en la extinción y reinstauración del condicionamiento por anfetamina.
2. Determinar el contenido de DA en Núcleo Accumbens y Área Tegmental Ventral tras el tratamiento con vasopresina y reexposición a anfetamina.
3. Determinar el contenido de GABA y glutamato en Núcleo Accumbens y Área Tegmental Ventral tras el tratamiento con vasopresina y reexposición a anfetamina.

Metodología

La metodología propuesta, para dar cumplimiento a los objetivos, contempla diversos focos y acciones, las cuales son:

Animales: Se utilizarán ratas macho Sprague-Dawley adolescentes (DPN 43 – 45), al ser un periodo altamente vulnerable para el desarrollo de abuso y adicción a drogas. Todos los animales serán

Página 2 de 7

Universidad de Santiago de Chile | Vicerrectoría de Investigación, Desarrollo e Innovación

Chacabuco # 675 | Santiago | Chile

Segundo piso | Teléfono: +56 2 27180293 - 294

www.cei.usach.cl | www.vridei.usach.cl



mantenidos bajo ciclos luz-oscuridad (12:12 horas), con una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad de $55 \pm 5\%$, y con acceso ilimitado a comida y agua. Todos los procedimientos experimentales serán evaluados y se realizarán de acuerdo con los protocolos establecidos por el Comité de Ética de la Universidad de Valparaíso.



Los animales serán aleatoriamente distribuidos en 4 grupos ($n=12$) y recibirán los siguientes tratamientos: Grupo 1, anfetamina (AMPH) por vía i.p. ($1,5 \text{ mg/kg}$) durante el condicionamiento y vehículo (NaCl 0,9%) vía intranasal durante el periodo de extinción; Grupo 2, AMPH y en periodo de extinción recibirá AVP ($20 \mu\text{g/kg}$) por vía intranasal; Grupo 3, tratado con vehículo (NaCl 0,9%; 1 ml/kg i.p.) durante el condicionamiento y extinción, y Grupo 4, vehículo (NaCl 0,9%; 1 ml/kg i.p.) y AVP intranasal durante el periodo de extinción.

Reactivos: La anfetamina sulfato (AMPH) fue donada por Laboratorios Chile SA. La arginina vasopresina (AVP) fue sintetizada por la Dra. Fanny Guzmán en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Lugar de preferencia condicionado a la droga (CPP): El aparato de CPP consiste en 3 compartimientos: uno blanco, uno negro y un corredor neutro de color gris que une a ambos compartimientos. El compartimiento blanco estará iluminado con 50 lux, el corredor neutro con 5 o menos lux, y el compartimiento negro con 1 o menos lux.

Para este estudio: con animales, se utilizará un protocolo de condicionamiento y recaída por anfetamina modificado. Este consistirá en 4 fases: (1) Pre-test, (2) Condicionamiento por anfetamina, (3) Extinción, y (4) Reinstauración del condicionamiento inducido por un priming de anfetamina.

Durante el pre-test, los animales serán colocados de manera individual en el compartimiento neutro con las puertas removidas para permitir el acceso y exploración a todo el aparato. Al comienzo por 2 minutos, a modo de familiarización, e inmediatamente después se llevará a cabo el pre-test propiamente tal. En el pre-test se grabará el tiempo de permanencia en cada compartimiento para determinar la línea base de preferencia. Los siguientes 5 días se condicionará a los animales por medio de dos sesiones de 60 minutos con un intervalo de 4 horas entre ellas. En la sesión de la mañana, todos los grupos recibirán una inyección de solución salina (0,9%, 1 ml/kg i.p.); los animales del grupo AMPH serán confinados por 60 minutos en el compartimiento negro y el grupo salino en el compartimiento blanco. En la tarde, los animales del grupo AMPH serán inyectados con anfetamina ($1,5 \text{ mg/kg i.p.}$) y serán confinados en el compartimiento blanco (o de menor preferencia) por 60 minutos; y los animales control recibirán una inyección de solución salina y serán confinados en el compartimiento negro.

Al día siguiente, 24 horas después de la última sesión de condicionamiento, los animales serán colocados en el compartimiento neutro y se les permitirá explorar libremente el aparato por 15 minutos, en ausencia de anfetamina y solución salina, con tal de evaluar el condicionamiento por AMPH. Posteriormente, para

Página 3 de 7



el proceso de extinción del condicionamiento, los animales AMPH y VEH serán divididos en dos, unos recibirán vía intranasal una dosis de vasopresina por 5 días, y los otros dos grupos recibirán solución salina vía intranasal y serán colocados diariamente en el aparato para exploración libre por 15 minutos. Finalmente, para la reinstauración del condicionamiento, se inyectará a los animales con una dosis de anfetamina (1,5 mg/kg) y se realizará un test de condicionamiento tal como el descrito anteriormente. La actividad de los animales será grabada y analizada posteriormente por medio del software ANY-Maze. Se analizará el tiempo de permanencia en cada compartimiento en el día del pre-test, test de condicionamiento, test de extinción y recaída.



Protocolo de administración intranasal: Se administrará vía intranasal una dosis de 20 µg/kg de AVP o vehículo (NaCl 0,9%) durante extinción del condicionamiento por anfetamina. Se utilizará una pipeta de 100 µl para aplicar bilateralmente 10 µl de solución, difundiendo por el epitelio escamoso del rinario izquierdo y derecho para su captación por cada fosa nasal, evitando la aplicación directa.

Extracción de tejidos: Inmediatamente después del análisis conductual, los animales serán sacrificados por decapitación y el cerebro será removido y seccionado, por medio de una matriz de cerebral, en cortes coronales de 2mm. Las rebanas con los núcleos y estructuras de interés serán colocados en un plato frío sobre hielo. El Núcleo Accumbens (entre 0,96 a 2,52 mm) será removido con un punch de tejido de 2 mm, y el Área Tegmental Ventral (entre -4,08 a -6,60 mm) con un punch de tejido de 1.5 mm, y serán pesados en una balanza analítica.

El tejido será homogenizado en 400 µL ácido perclórico 0,2M, será posteriormente centrifugado por 30 minutos a 12.000 rpm a 4°C y el sobrenadante filtrado por medio de un filtro de jeringa de politetrafluoroetileno (PTFE) con un tamaño de poro de 0,22 µm. Los filtrados serán almacenados en -80°C para el análisis posterior de contenido de DA, GABA y Glutamato.

Cuantificación de DA: El contenido de DA en Nacc y VTA será determinado por medio de HPLC acoplado a detector electroquímico, el cual cuenta con un Inyector Rheodyne, una bomba isocrática (Modelo PU-2080 Plus, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan), una columna C18 (Modelo MF-8912, BAS, West Lafayette, IN, USA) y un detector electroquímico (Modelo LC-4C, BAS, West Lafayette, IN, USA) configurado a un potencial de oxidación de 650 mV y una sensibilidad de 0.5 nA. La fase móvil contiene 0,1 M de NaH₂PO₄, 1 mM ácido octano-1-sulfónico, 1 mM EDTA y 8,0% CH₃CN (pH 3,4), el cual será bombeado a un flujo de 125 mL/min. El contenido de DA será analizado comparando el área del pico y tiempo de elución de la muestra con estándares de referencia, y se calcularán las concentraciones a través de una curva de calibrado para cada neurotransmisor realizada con un programa cromatográfico (Program ChromPass, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan).

Cuantificación de GABA y Glutamato (GLU): El contenido de GABA y glutamato en Nacc y VTA será determinado por medio de HPLC acoplado a detector fluorométrico. 20 µL de la muestra será mezclada

Página 4 de 7



con 4 µL de buffer borato (pH 10,8), y se le adicionará 4 µL de reactivo fluorogénico (20 mg de ortoftaldehído y 10 µL de b-mercaptoetanol en 5 mL de etanol) para la reacción de derivatización. Luego de 90s, las muestras serán inyectadas al equipo de HPLC acoplado a detector fluorométrico, el cual cuenta con bomba isocrática (modelo PU-4180, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón), una columna de fase reversa C-18 (Kromasil 3-4.6; Suecia) y un detector fluorométrico (modelo FP-4025, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón). La fase móvil contiene 0,1M de NaH₂PO₄ y 24% CH₃CN (pH ajustado a 5,7), el cual será bombeado a un flujo de 0,8 mL/min. El tiempo de retención para GABA es entre 11 a 14 minutos aproximadamente y para glutamato es de 2 minutos aproximadamente. El contenido de GABA y GLU será analizado comparando el área del pico y tiempo de elución de la muestra con estándares de referencia, y se calcularán las concentraciones a través de una curva de calibrado para cada neurotransmisor realizada con un programa cromatográfico (ChromNAV 2.0, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan).



Análisis estadísticos: Los análisis estadísticos serán realizados por medio del programa GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). La distribución de los datos será evaluada por medio de la prueba de Shapiro-Wilk. Para determinar diferencias significativas entre los grupos, se llevará a cabo ANOVA de una vía y dos vías, y post-test bonferroni. Los datos serán presentados como la media ± error estándar de la media.

IV. ANÁLISIS ÉTICO

El proyecto presenta un alto valor social y valor científico dado que busca dilucidar, el potencial impacto de la vasopresina como agente de control de adicción a drogas como anfetaminas, los estudios contemplan animales de experimentación y en términos generales los objetivos presentados presentan una alta consistencia con la metodología propuesta, presenta la rigurosidad conducente a una Tesis de Magister, en base a esto aportar con información relevante para la salud pública.

V. ANÁLISIS DE BIOSEGURIDAD

La Investigadora entregan por esta vía el protocolo de bioseguridad indicando lo siguiente:

- No se manipularán compuestos radioactivos.
- No se manipula ningún compuesto carcinogénico y genotóxicos
- No se trabajará con técnicas de ADN recombinante.
- No se trabajará con organismos modificados genéticamente.
- Se trabajará con compuestos que se encuentra bajo la Ley 20.000.

El proyecto se ejecutará con metodologías establecidas y coherentes, en laboratorios apropiados de investigación. La investigación considera la evaluación del material biológico y animales de experimentación y se declara el personal a cargo y competente para estos fines, junto con los mecanismos de eliminación de muestras.

Página 5 de 7



Se considera la utilización de Sulfato de anfetamina D-L (compuesto sujeto a Ley 20.000), la cual es donada por Laboratorios Chile y presenta un registro de los destinatarios. La Dra. Renard está a cargo de la droga, la cual se encuentra en una caja con llave a su cargo según resolución del ISP que se adjunta. Se entrega una cantidad suficiente para realizar experimentos en curso según foto de hoja de registro adjunta. La anfetamina se prepara cada vez que comienza un experimento y se prepara diluida en solución salina estéril la cantidad suficiente para el experimento crónico. Si sobra algo de la solución esta se guarda en frascos de vidrio para desechos de anfetamian y luego se envían para eliminación (empresa Veolia®).

El estudio contempla animales de experimentación y se detalla el procedimiento y vías de eliminación de estas muestras biológicas, indicando que los restos animales generados serán dispuestos en bolsas plásticas gruesas marcadas especialmente como desechos biológicos y almacenadas en un congelador de uso exclusivo a -20 ° C hasta el retiro por la empresa contratada para su posterior incineración (Veolia®).

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a todos los antecedentes presentados al Comité de Ética Institucional por la investigadora Dra. Georgina Renard y la Tesista de Magister en Neurociencias Andrea Fuentes, se concluye que el proyecto de Tesis de Magister titulado " *Rol de la vasopresina en la recaída por anfetamina en ratas adolescentes Sprague-Dawley*" cumple con los estándares éticos y de bioseguridad exigidos, ajustándose a las especificaciones contenidas en el "Manual de normas de bioseguridad y riesgos asociados" editado por CONICYT, versión 2018, por lo que queda en calidad de **Aprobado** en términos de bioseguridad y condicionado a la aprobación del Área de Animales de Experimentación.

Téngase presente que el Comité Ético Científico de la USACH está re-acreditado por la SEREMI de Salud RM mediante Resolución Exenta N°011494 de fecha 13 octubre 2020, y este informe aprobatorio tiene vigencia por el tiempo que dure el proyecto. Cabe señalar que cualquier modificación ocurrida en la metodología en el transcurso de la ejecución del proyecto debe ser informada oportunamente al Comité de Ética Institucional.



Saludan atentamente,

Dr. Juan Francisco Silva

Coordinador Subrogante Área Ciencias
Químicas, Medio Ambiente y Bioseguridad



Ing. Francisca Miranda Báez

Coordinadora Alternativa Área Ciencias
Químicas, Medio Ambiente y Bioseguridad

Distribución

- 1.- Dra. Georgina Renard - CIBAP
- 2.- Archivo Comité de Ética



Dra. Georgina Renard
Andrea Fuentes
Escuela de Medicina
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad de Santiago de Chile
Presente



Estimada Dra. Georgina Renard

Junto con saludar, se hace llegar a usted el presente informe emitido por el Área de Ciencias de Animales de experimentación del Comité de Ética Científico Institucional:

I. IDENTIFICACIÓN

TÍTULO DEL PROYECTO:	" ROL DE LA VASOPRESINA EN LA RECAÍDA POR ANFETAMINA EN RATAS ADOLESCENTES SPRAGUE-DAWLEY"
TIPO DE PROYECTO:	Tesis de Magister en Neurociencias Fuentes de financiamiento: DICYT Regular 022101RSSA
INVESTIGADOR/A RESPONSABLE:	Dra. Georgina Renard Andrea Fuentes
ALUMNA TESISISTA	
LABORATORIO/ UNIDAD ACADÉMICA:	Centro de Investigaciones Biomédicas y Aplicadas (CIBAP).
DEPARTAMENTO:	Departamento de Biología
FACULTAD:	Ciencias Médicas
CORREO ELECTRÓNICO:	georgina.renard@usach.cl

II. DOCUMENTOS TENIDOS A LA VISTA PARA LA EMISIÓN DE ESTE INFORME:

- Enmienda Protocolo de Cuidado y Manejo de animales de experimentación y Supervisión de animales
- Compromiso de confidencialidad actualizado

III. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

Los adolescentes representan uno de los grupos etarios de mayor consumo de anfetamina (AMPH) como uso recreacional, conllevando a un mayor riesgo de abuso y dependencia de drogas. Esto representa un serio y preocupante problema de salud pública, no obstante, en la actualidad no existen fármacos efectivos para el tratamiento para adicción a drogas. Se ha demostrado que el sistema vasopresinérgico tiene un rol importante en el proceso de adicción a drogas, adquiriendo gran interés como blanco terapéutico. Es importante destacar que existen diferencias sexuales no sólo en la adicción a drogas de abuso donde las mujeres escalan en el consumo más rápido que los hombres y con síndrome de abstinencia más pronunciados, sino que también el sistema vasopresinérgico presenta diferencias sexuales. La presente investigación propone estudiar la



influencia de la administración de vasopresina (AVP) en el proceso de extinción (o abstinencia) sobre la recaída tras la re-exposición a AMPH en ratas macho y hembras. El estudio pretende proporcionar un sustento para la formulación de fármacos eficaces para el tratamiento de pacientes con adicción con los que se espera reducir el sufrimiento y mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias.

Objetivo general

Determinar el efecto de la administración intranasal de vasopresina durante el proceso de extinción del condicionamiento por AMPH en la reinstauración del mismo tras la reexposición a la droga.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la administración intranasal de vasopresina, durante el proceso de extinción, en la extinción y reinstauración del condicionamiento por anfetamina.
2. Determinar el contenido de DA en Núcleo Accumbens y Área Tegmental Ventral tras el tratamiento con vasopresina y reexposición a anfetamina.
3. Determinar el contenido de GABA y glutamato en Núcleo Accumbens y Área Tegmental Ventral tras el tratamiento con vasopresina y reexposición a anfetamina.



IV. ANÁLISIS BIOÉTICO

Los antecedentes de enmienda del proyecto de Tesis de Magíster en Neurociencias de la Universidad de Valparaíso de la Srta. Andrea Fuentes donde el Investigador responsable es la Dra. Georgina Renrad, se analizaron por el Área de Coordinación de Ciencias Biológicas de Animales de Experimentación de nuestro Comité, no presentándose observaciones que impidan el desarrollo del Proyecto.

Se autoriza la participación de las siguientes personas al protocolo de cuidado y manejo:

Valeska Cid y Macarena Moreno.

Se solicita incorporar al protocolo ratas hembras, quedando para este propósito un total de 98 ratas machos y hembras cepa *Sprague Dawley*, Animales reproducidos en la Sala de mantención CIBAP.

V. CONCLUSIONES

En conclusión, el Área de Ciencias de Animales de experimentación del Comité de Ética Institucional, ha recibido y analizado el Proyecto de Tesis de Magister titulado: “**Rol de la vasopresina en la recaída por anfetamina en ratas adolescentes Sprague- Dawley**”, considerando los principios de las tres R (Russell y Burch, 1959), la **Ley 20.380 Sobre protección de Animales, en su Título IV, De los experimentos en animales vivos, Artículos 6°, 7°, 8°, 9° y 10°** y del análisis realizado por este Comité, mediante la presente se informa a la Dra. Georgina Renard y a la Srta. Andrea Fuentes que su proyecto se encuentra **APROBADO hasta mayo de 2023**.

Téngase presente que el Comité Ético Científico de la USACH está re-acreditado por la SEREMI de Salud RM mediante Resolución Exenta N°011494 de fecha 13 octubre 2020, y este informe aprobatorio tiene vigencia por el tiempo que dure el proyecto. Cabe señalar que cualquier



modificación ocurrida en la metodología en el transcurso de la ejecución del proyecto debe ser informada oportunamente al Comité de Ética Institucional.

Saludan atentamente,

MV Carolina Marchant C.
Coordinadora Alternativa Área de Ciencias de
Animales de Experimentación
Comité de Ética Institucional



Dr. Pedro Orihuela
Coordinador Área de Ciencias de
Animales de Experimentación
Comité de Ética Institucional

Distribución

- 1.- Dra. Georgina Renard - Facultad de Ciencias Médicas
- 2.- Archivo Comité de Ética-