



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

**“ROL DE LA VASOPRESINA Y SU RECEPTOR V_{1A} EN EL SEPTUM LATERAL
SOBRE LA MODULACIÓN DEL CIRCUITO DE LA RECOMPENSA Y
CONDUCTAS TIPO ADICTIVAS”**

MACARENA FRANCISCA GÁRATE PÉREZ
Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Directora de Tesis:
Dra. Georgina María Renard

Universidad de Valparaíso

2019

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, agradecer a mi familia en especial a mis padres, Juan y María Alejandra, que permitieron el desarrollo de mi vida académica con todos los contratiempo y tropiezos que ha tenido esta parte de mi vida. Agradecer a mis hermanos pequeños María José y Oliver Jean por entretenerme y aguantarme. Agradecer a mi abuela Susana por adoptarme en su hogar en Santiago. Segundo agradecer a mis amigos Catherine Pérez (Maria), Fernanda Olivares (Pitufa), Macarena Moreno (pollín), Belén Pérez (bele), Constanza Ruiz (Cony), y Francisca González (Cuchi) por siempre estar ahí y brindar palabras de apoyo y recordarme que siempre hay alguien que está peor que uno.

Tercero, agradecer a mi tutora la Dra. Georgina Renard por adoptarme literalmente en su laboratorio luego de mi exilio forzoso de Valparaíso, agradecerle que me haya enseñado y me esté enseñando muchas cosas entretenidas (académicas, no académicas, experimentales y no experimentales), enseñarme a tomar mate y por sobre todo agradecer la paciencia que me tiene como ser humano y como miembro estrella de su equipo de investigación.

También agradecer a mis compañeritas de laboratorio (Vale, Jens, Fran, Clau y Gaby) que hicieron y hacen de mi estadía en el laboratorio un lugar muy grato para trabajar.

Cuarto agradecer a la comisión en especial a Dr. Ramón Sotomayor por mostrarme la luz al final del túnel, indicándome los pasos que debía seguir para poder cambiarme a ésta tesis, también agradecer al Dr. Agustín Martínez por confiar que en un plazo relativamente corto íbamos a poder lograr terminar esta nueva aventura.

Por último y no menos importante agradecer a todos los profesores que pasaron por esta etapa de mi carrera, y de los cuales aprendí cómo hay que comportarse y cómo no.

ÍNDICE

LISTA DE ESQUEMAS	4
LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I.- INTRODUCCIÓN	9
1.1 Adicción y el circuito de la recompensa.....	9
1.2 Anfetamina	12
1.2.1 Mecanismo de acción de la AMPH.....	13
1.3 Sistema vasopresinérgico y septum lateral	15
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
2.1 Hipótesis.....	17
2.2 Objetivo general	17
2.3 Objetivos específicos:.....	17
III.- METODOLOGÍA.....	18
3.1 Bioética.....	18
3.2 Animales de experimentación y condiciones de mantención	18
3.3 Drogas	18
3.4 Diseño experimental	19
3.5 Cirugía para el implante de cánulas guías.....	20
3.6 Protocolo de preferencia de lugar condicionado a AMPH	22
3.7 Protocolo de microinyección	23
3.8 Fijación del tejido para IHQ.....	23
3.9 IHQ Fos.....	24
3.10 Microdiálisis <i>in vivo</i> en animales anestesiados	26
3.11 Tinción de secciones coronales.....	29
3.12 Cuantificación de neurotransmisores	29
3.12.2 Dopamina.....	30
3.13 Análisis estadístico	30
IV.- RESULTADOS	32

4.2 Efecto sobre la actividad locomotora luego de la microinyección de AVP en el LSD en animales condicionados a AMPH	34
4.2.1 Distancia total recorrida	34
4.2.2 Velocidad media	34
4.3 Efecto sobre la actividad neuronal en Acb, luego de la microinyección de AVP en el LSD en animales condicionados a AMPH	36
4.4 Efecto de la microinyección de AVP en el LSD en animales condicionados a AMPH sobre los niveles extracelulares de DA y GABA en el Acb	41
4.4.1 Dopamina	41
4.4.2 GABA	41
V.- DISCUSIÓN	43
5.1 Mecanismo propuesto	48
VI.- CONCLUSIÓN	49
VII.- PROYECCIÓN	50
VIII.- APÉNDICE	51
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Circuito de la recompensa	12
Esquema 2. Representación de las moléculas de adrenalina, dopamina y amfetamina	13
Esquema 3. Mecanismo de AMPH	14
Esquema 4. Grupo experimentales	19
Esquema 5. Diseño experimental	20
Esquema 6. Esquema representativo perfusión transcardial	24
Esquema 7. Zona de IHQ	26
Esquema 8. Mecanismo propuesto	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Zona de implante cánulas.....	21
Figura 2. Caja de CPP	23
Figura 3. Diseño experimental microdiálisis	28
Figura 4. Efecto de AVP intra-LSD sobre el condicionamiento a AMPH	33

Figura 5. Efecto de AVP intra-LSD en animales condicionados a AMPH sobre la actividad locomotora	36
Figura 6. Efecto de AVP intra-LSD en animales condicionados a AMPH sobre la actividad neuronal	40
Figura 7. Efecto de AVP intra-LSD en animales condicionados a AMPH sobre los niveles extracelulares de DA y GABA en el Acb.....	42
Figura suplementaria 1. Figura suplementaria	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Acb	Núcleo accumbens
AcbC	Núcleo accumbens core
AcbSh	Núcleo accumbens shell
AMPH	Anfetamina
Ant V_{1A}	(d(CH ₂) ₅₁ , Tyr(Me) ₂ , Arg ₈)-Vasopresina
AVP	[Arg ₈]-Vasopresina
BNST	Lecho de la estría terminal o <i>Bed nucleus of the stria terminalis</i>
BSA	Albúmina bovina
CPP	Preferencia a un lugar condicionado
D₁	Receptor de dopamina tipo 1
D₂	Receptor de dopamina tipo 2
DA	Dopamina
DAB	Diaminobenzidina
DAT	Transportador de dopamina
Día Exp	Día experimental
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
i.p	Intra peritoneal
IHQ	Inmunohistoquímica
LCRa	Líquido cefalorraquídeo artificial
LS	Septum lateral
LSD	Septum lateral dorsal

LSI	Septum lateral intermedio
LSV	Septum lateral ventral
MeA	Amígdala medial
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PFA-PBS	Solución de paraformaldehído en solución salina tamponada con fosfato
PFC	Corteza prefrontal
PVN	Núcleo paraventricular
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
s.c	Sub cutáneo
SEM	Error estándar de la media
SON	Núcleo supra óptico
TPLB	Tiempo de permanencia en el lado blanco
VMAT₂	Transportador vesicular de monoaminas 2
VTA	Área tegmental ventral

RESUMEN

El septum lateral (LS) es un núcleo GABAérgico implicado en las conductas adictivas y en la modulación del circuito de la recompensa. La anfetamina (AMPH), droga de abuso, aumenta los niveles de dopamina (DA) en el núcleo accumbens (Acb), alterando el circuito de la recompensa. El LS expresa una alta densidad de receptores de vasopresina 1A (V_{1A}), generando un aumento del tono inhibitorio en este núcleo. Nuestra hipótesis es que la vasopresina (AVP) en el LS disminuye el condicionamiento a AMPH, disminuyendo la actividad neuronal en el Acb, por medio de la disminución del tono dopaminérgico y el aumento del tono GABAérgico en este núcleo. Ratas machos *Sprague-Dawley* (300-350 g) fueron sometidas a un protocolo de preferencia al lugar condicionado (CPP), el cual evalúa el efecto recompensante de las drogas. Los animales fueron inyectados con AMPH (1.5 mg/kg i.p) durante 4 días. Luego se microinyectó vehículo, AVP o antagonista del receptor V_{1A} (Ant V_{1A}) + AVP en el septum lateral dorsal (LSD), y se evaluó el nivel de condicionamiento. Dos horas post microinyección, se cuantificó la actividad neuronal en el AcbCore (AcbC) y AcbShell (AcbSh) por medio de la inmunorreacción de Fos. Además, en otro grupo de animales condicionados a AMPH, se realizó una microdiálisis en el Acb en conjunto con una microinyección de AVP en el LSD. Observamos que los animales microinyectados con vehículo en el LSD y sometidos a CPP, generan condicionamiento a AMPH ($p = 0.0093$), mientras que los animales microinyectados con AVP en el LSD no se condicionan a AMPH ($p = 0.7131$). Con respecto a la actividad neuronal en el Acb, se observó una disminución de la inmunorreacción de Fos en los animales microinyectados con AVP en el LSD respecto al vehículo en el AcbC ($p = 0.0542$) al igual que en el AcbSh ($p = 0.0161$). Esta disminución se revierte en el grupo Ant V_{1A} + AVP en el AcbC ($p = 0.9888$) y en el AcbSh ($p = 0.6582$), respecto al vehículo. En la microdiálisis se observó que al microinyectar AVP intra-LSD, disminuyen los niveles de DA extracelulares ($p = 0.0231$) en el Acb, mientras que la liberación de GABA ($p > 0.9999$) no cambia. Por lo tanto, los receptores V_{1A} del LSD se encontrarían implicados en la modulación de conductas tipo adictivas proyectándose como un nuevo blanco neurofarmacológico en la modulación del circuito de la recompensa.

ABSTRACT

The lateral septum (LS) is a GABAergic nucleus involved in addictive behaviors and in the modulation of the reward circuit. Amphetamine (AMPH), a drug of abuse, increases dopamine (DA) levels in the nucleus accumbens (Acb) altering the reward circuit. The LS expresses a high density of vasopressin 1A receptors (V_{1A}), which generate an increase in the inhibitory tone in this nucleus. Our hypothesis is that vasopressin (AVP) in the LS decreases the conditioning to AMPH and decreases neuronal activation in the Acb, by decreasing dopaminergic tone and increase in inhibitory tone in this nucleus. Male *Sprague-Dawley* rats (300-350 g) were subjected to conditioned place preference (CPP), which evaluates the rewarding effect of the drugs. The animals were injected with AMPH (1.5 mg/kg i.p) for 4 days. Vehicle, AVP or antagonist of the V_{1A} (Ant V_{1A}) + AVP was then injected into the dorsal lateral septum (LSD) and conditioning was evaluated. Neuronal activity in the AcbCore (AcbC) and AcbShell (AcbSh) was quantified by Fos. In addition, a microdialysis was performed in the Acb to measure DA and GABA levels, meanwhile AVP was microinjected in LSD of animals subjected to AMPH CPP. We observed that animals subjected to AMPH CPP and microinjected with vehicle developed AMPH preference ($p = 0.0093$) while microinjection of AVP in the LSD prevented this behavior ($p = 0.7131$). A decrease in the immunoreaction of Fos was observed in the animals microinjected with AVP in the LSD with respect to vehicle in AcbC ($p = 0.0542$) and AcbSh ($p = 0.0161$). This decrease is reversed in the Ant V_{1A} + AVP group in AcbC ($p = 0.9888$) and AcbSh ($p = 0.6582$) with respect to vehicle. The microinjection of AVP in LSD produces a decrease of DA levels in Acb ($p = 0.0231$), while GABA ($p > 0.9999$) does not change. Therefore, V_{1A} receptors in the LSD would be involved in the modulation of addictive behaviors, being a new neuropharmacological target for the modulation of the reward circuit.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1 Adicción y el circuito de la recompensa

En la naturaleza existen comportamientos biológicamente esenciales y recompensantes que permiten, mediante el refuerzo positivo, la consolidación de recuerdos fundamentales para la sobrevivencia, como la ubicación de agua, la ubicación de alimentos, el reconocimiento sexual y el reconocimiento parental entre otros. Estas conductas naturales que tienen un efecto recompensante son la interacción social, el apareamiento, alimentarse entre otros. Sin embargo, existen otras conductas inducidas, como el consumo de drogas, capaces de generar una recompensa aún mayor (Gardner, 2011).

El efecto recompensante producido por las conductas naturales e inducidas, está mediado principalmente por el circuito dopaminérgico mesocorticolímbico o circuito de la recompensa (White y Milner, 1992; Koob y Le Moal, 1997; Nestler, 2005). Frente a experiencias gratificantes, ya sean naturales o inducidas, se activan las neuronas del área tegmental ventral (VTA) que proyectan eferencias dopaminérgicas hacia el núcleo accumbens (Acb), el septum lateral (LS) y la corteza prefrontal (PFC), entre otros (Assaf y Miller, 1977; Risold y Swanson, 1997; Koob y Volkow, 2010). Éste circuito es regulado por las proyecciones de las neuronas GABAérgicas provenientes del Acb y el LS. Específicamente el Acb proyecta eferencias hacia el VTA, mientras que el LS proyecta hacia el Acb y el VTA (Staiger y Nurnberger, 1991). Además, las interneuronas GABAérgicas del VTA, LS y Acb regulan la actividad intrínseca de cada uno de estos núcleos. Por su parte, la PFC envía proyecciones glutamatérgicas hacia el Acb, el VTA y el LS, lo que permite tener un control cortical de este circuito (McBride *et al.*, 1999) (**esquema 1**).

Conductas recurrentes como el consumo crónico de drogas, aumentan la probabilidad de desencadenar trastornos neuropsiquiátricos como la adicción que se caracteriza por la búsqueda y consumo compulsivo de drogas. La adicción se ha relacionado con la desregularización progresiva de las redes neuronales que median la recompensa, produciendo inicialmente un estado emocional positivo, mediado por el efecto recompensante, y un estado emocional negativo originado principalmente por la abstinencia lo que impulsa al sujeto a la búsqueda de droga por medio del reforzamiento negativo (Koob y Le Moal, 1997; Koob, 2008).

El efecto recompensante y locomotor que generan las drogas psicoestimulantes, ha sido ampliamente estudiado, demostrando que la liberación de dopamina (DA) en el Acb es el principal encargado de modular este tipo de conductas (Roberts *et al.*, 1980; Di Chiara y Imperato, 1988; Hurd *et al.*, 1989; Robledo, 1992; Wise, 1993; Pontieri *et al.*, 1995; Di Chiara, 2000; Volkow y Li, 2004; Mathews y Mccornick, 2007). Por lo que el Acb, es considerado el principal blanco neuroanatómico de las drogas de abuso (Wise, 1993).

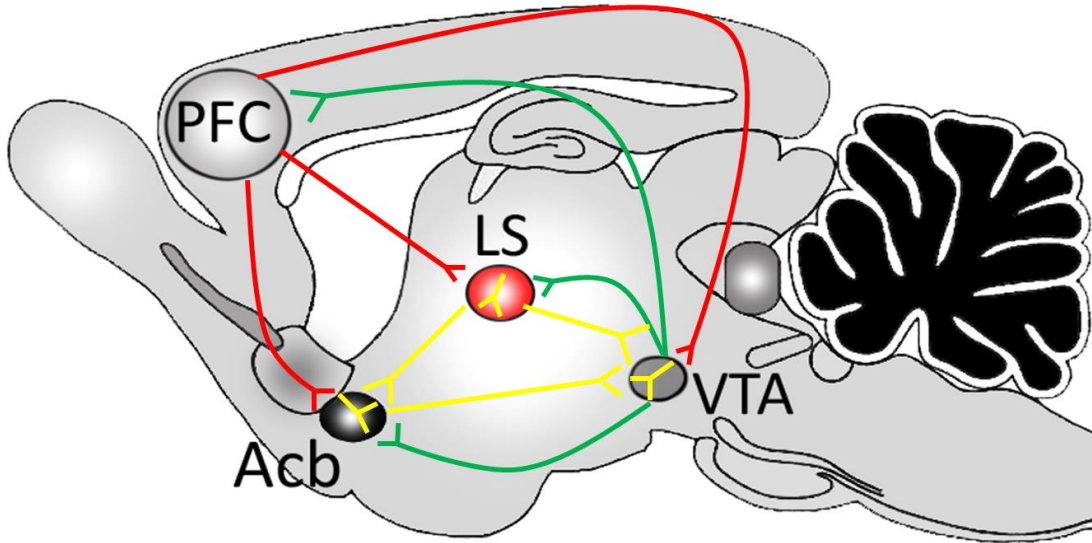
En ratas, el Acb presenta una diferenciación inmunohistoquímica y una diferenciación ultraestructural que permite la localización de dos zonas funcionalmente distintas, las que se conocen como Acb Core (AcbC) y Acb Shell (AcbSh) (Zaborszky *et al.*, 1985; Meredith *et al.*, 1990; Usuda *et al.*, 1998). Por ejemplo, la presentación inesperada de un estímulo condicionado asociado a cocaína produce un aumento de los niveles extracelulares de DA en el AcbC, pero no en el AcbSh (Ito *et al.*, 2000). Por otra parte, cuando se libera DA en el AcbSh, se genera el efecto recompensante (Parkinson *et al.*, 2000).

También se ha observado la existencia de un gradiente rostro-caudal en relación a los terminales y a los receptores que se expresan en el Acb, el cual representa un nivel adicional de organización que se establece en términos estructurales y funcionales (Voorn y Docter, 1992; Caboche *et al.*, 1993; Rogard *et al.*, 1993; Ranaldi *et al.*, 1994; Carey *et al.*, 1998). En este sentido, el VTA proyecta eferencias dopaminérgicas que sinaptan en su mayoría en la zona caudal del Acb (Hökfelt *et al.*, 1980; Phillipson *et al.*, 1985; Meidahl *et al.*, 2016), estableciendo una alta densidad de terminales dopaminérgicos en ésta zona (Caboche *et al.*, 1993). Además, se ha observado que en la zona rostral del Acb hay una mayor densidad de los receptores de DA tipo 1 (D₁) y de receptores de DA tipo 2 (D₂), los que producen un efecto excitatorio e inhibitorio respectivamente (Allin *et al.*, 1989; Bardo y Hamemer, 1991; Cepeda y Levine 1998; Zheng *et al.*, 1999; Chen y Yang, 2002).

Por otro lado, la participación de otros núcleos como el LS en conductas recompensantes no es reciente. Los estudios realizados por Olds y Milner (1954) ya mostraban que la autoestimulación en el área septal generaba un refuerzo positivo. El LS es un núcleo GABAérgico que proyecta eferencias hacia el Acb, el VTA y la PFC entre otros núcleos, y se ha propuesto como un modulador del circuito de la recompensa (Conrad y Pfaff, 1976; Nauta *et al.*, 1978; Sheehan, *et al.*, 2004; Jonsson *et al.*, 2015). Más aun, se ha observado que la manipulación farmacológica del LS, con α -flupentixol y sulpirida, ambos

antagonistas dopaminérgicos y d-anfetamina como agonista dopaminérgico, genera una disminución en el metabolismo de DA en el Acb en presencia de los antagonistas y un aumento del metabolismo de DA en el Acb en presencia de d-anfetamina (Louilot *et al.*, 1989), indicándolo como un elemento clave en la modulación de conductas tipo adictivas (Ryabinin *et al.*, 2008). En esta misma línea se ha demostrado que la inhibición farmacológica del LS con muscimol y baclofeno, agonistas de los receptores ácido gamma-aminobutírico A (GABA_A) y GABA_B respectivamente, inhibe la recaída a la búsqueda de cocaína inducida por contexto e inhibe la expresión de la conducta de preferencia a un lugar condicionado (CPP) a cocaína (Luo *et al.*, 2011; Sartor y Aston Jones, 2012). Por lo tanto, la interconexión del LS con regiones del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico implicado en el control de la motivación y la adicción (Sheehan *et al.*, 2004) lo sitúan como un núcleo de gran relevancia en la modulación de éste tipo de conductas.

El LS presenta proyecciones GABAérgicas hacia diferentes áreas cerebrales, tanto corticales como subcorticales (Swanson y Cowan, 1979). De nuestro interés, el LS proyecta eferencias GABAérgicas específicamente al AcbSh (Zahm *et al.*, 2013). Sin embargo, podría existir un grado de diferenciación rostro-caudal con respecto a las proyecciones GABAérgicas proveniente del LS al Acb que no han sido clarificadas. Además, se han descrito neuronas de proyección GABAérgicas desde el septum lateral dorsal (LSD) hacia la porción antero-ventral del VTA (Luo *et al.*, 2011). El VTA contiene neuronas dopaminérgicas de proyección e interneuronas GABAérgicas que regulan la actividad dopaminérgica de éste núcleo (Gysling y Wang, 1983). Se ha observado que las neuronas GABAérgicas de proyección provenientes del LS sinaptan con las interneuronas GABAérgicas del VTA que modulan el disparo de las neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el Acb (Luo *et al.*, 2011; Ciccarelli *et al.*, 2012; Vega-Quiroga *et al.*, 2018). Así, las neuronas GABAérgicas de proyección del LSD estarían sinaptando con las interneuronas GABAérgicas del VTA, inhibiéndolas, y así, disminuyendo la liberación de GABA en el VTA, facilitando el disparo de las neuronas dopaminérgicas (Luo *et al.*, 2011; Vega-Quiroga *et al.*, 2018).



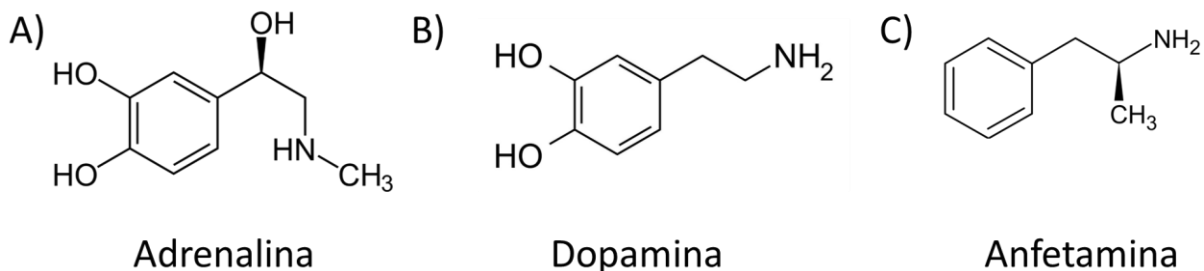
Dopaminérgica — **GABAérgica** — **Glutamatérgica** —

Esquema 1. Circuito de la recompensa. Desde el área tegmental ventral (VTA) se proyectan neuronas dopaminérgicas hacia la corteza prefrontal (PFC), septum lateral (LS) y núcleo accumbens (Acb). El LS envía proyecciones GABAérgicas hacia VTA y Acb. El Acb envía proyecciones GABAérgicas hacia el VTA. La PFC envía proyecciones glutamatérgicas hacia el Acb, VTA y el LS.

1.2 Anfetamina

La anfetamina (AMPH) es un psicoestimulante considerado una droga de abuso (Di Chiara y Imperato, 1988). Posee una estructura química muy parecida a la adrenalina y la dopamina (**esquema 2**), lo que le permite tener un efecto en el sistema nervioso central, y actuar como simpaticomimético en el sistema nervioso periférico (Alles, 1933; Prinzmetal y Bloomberg, 1935).

A nivel central, produce sensación de alerta, estimulación, una mejoría del rendimiento intelectual, mejora de tareas manuales, sensación de energía, disminución del cansancio, del sueño y del hambre debido a sus propiedades anorexígenas. A nivel periférico produce un incremento del diámetro pupilar (midriasis), sequedad de boca, sudoración, temblor, tensión mandibular (trismo), movimientos masticatorios o rechinar de dientes (bruxismo), un ligero incremento de la temperatura corporal, aumenta la presión arterial y la frecuencia cardíaca (palpitaciones o taquicardia) (Robledo, 2008).

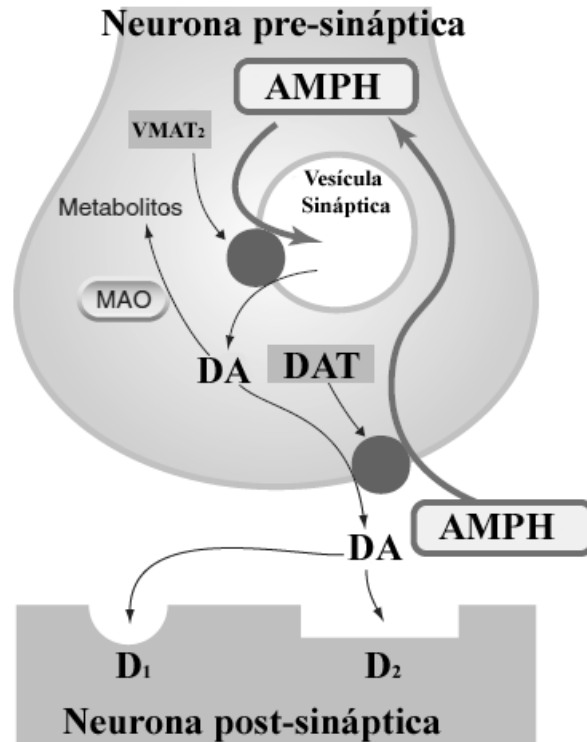


Esquema 2. Representación de las moléculas de A) adrenalina, B) dopamina y C) anfetamina. Las tres moléculas presentan una forma molecular muy parecida, lo que les permite tener características similares.

1.2.1 Mecanismo de acción de la AMPH

La AMPH como droga psicoestimulante interactúa con el sistema dopaminérgico y noradrenérgico (Wise, 1996) y en menor medida con el sistema serotoninérgico (Kankaanpaa *et al.*, 1998), todos con participación, directa o indirecta, en el circuito de la recompensa (Rothman y Baumann, 2003). Se ha demostrado que la AMPH induce la autoadministración en animales de experimentación como ratas (Pickens y Harris, 1968) y monos (Deneau *et al.*, 1969). El poder adictivo de la AMPH viene dado por su mecanismo de acción. La administración periférica de la AMPH genera un aumento de las concentraciones extracelulares de DA en Acb por liberación no-vesicular (Di Chiara y Imperato, 1988; Rothman y Baumann, 2003; Sulzer *et al.*, 2005). Este efecto en los niveles extracelulares de DA, viene dado por el cambio en la dirección del flujo del transportador de DA (DAT) y el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT₂) (Robledo, 2008).

El DAT es responsable de la recaptación de DA cuando es liberada al espacio sináptico (Rothman y Baumann, 2003; Sulzer *et al.*, 2005) mientras que el VMAT₂ recaptura la DA sintetizada en el citoplasma hacia las vesículas de almacenamiento (Partilla *et al.*, 2006). La AMPH interrumpe el gradiente de protones existentes en las membranas de las vesículas sinápticas y su funcionamiento (Sulzer *et al.*, 2005). Bajo este mecanismo se invierte el flujo de estos transportadores produciendo un aumento de las concentraciones de DA en el citoplasma, lo que permite que el DAT libere DA al espacio sináptico (Sulzer *et al.*, 2005) (**esquema 3**).



Esquema 3. Mecanismo de acción de la AMPH. La AMPH ingresa por medio del DAT al terminal presináptico e invierte el funcionamiento del DAT y del VMAT₂ permitiendo la liberación no-vesicular de DA.

Frente al consumo de AMPH, las principales áreas cerebrales afectadas son el Acb, estriado dorsal y la PFC, siendo la DA en el Acb la que genera el reforzamiento positivo inicial a la droga (Shoblock y Sullivan, 2003). Al mismo tiempo, el aumento en la actividad locomotora, propiedad que es exacerbada por los psicoestimulantes, es provocado por la liberación de DA en el AcbC (Groenewegen *et al.*, 1996).

En esta misma línea, estudios han demostrado que una inyección aguda de AMPH (2 mg/kg i.p) incrementa la liberación de DA en el Acb, pero no en el LS (Sotomayor *et al.*, 2010). Sin embargo, en el LS se observó un incremento en los niveles extracelulares de GABA (Sotomayor *et al.*, 2010). Más aun, al perfundir intraseptalmente un antagonista específico para los receptores GABA_B (CGP-52432), en presencia de una dosis aguda de AMPH (2 mg/kg i.p) se observa un aumento de la liberación de DA en el LS. En adición, se ha demostrado, que la administración de AMPH (i.p), aumenta la actividad de las neuronas de proyección del LS hacia el VTA, indicándolo como un modulador de las conductas tipo adictivas (Colussi-Mas *et al.*, 2007).

Por tanto, el LS estaría jugando un rol clave en la modulación de los niveles de DA, tanto en el VTA como en el Acb.

1.3 Sistema vasopresinérgico y septum lateral

La vasopresina (AVP) es un neuropéptido sintetizado principalmente por las neuronas vasopresinérgicas del núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo supraóptico (SON) del hipotálamo. La AVP participa en la regulación de la homeostasis osmótica y la respuesta frente a un estresor (Caldwell *et al.*, 2008). También ha sido implicada en la modulación de recompensas naturales como las conductas sociales, donde el LS tiene un rol importante en los efectos que produce éste neuropéptido sobre estas conductas (Donaldson *et al.*, 2008; Lukas *et al.*, 2012).

La AVP actúa mediante la activación de tres receptores, los receptores V_{1A} , V_{1B} y V_2 , todos ellos pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteína G. El receptor V_2 se encuentra acoplado a proteína G_s y los receptores V_{1A} y V_{1B} se encuentran acoplados a proteína $G_{\alpha q/11}$ (Michell *et al.*, 1979; Jard *et al.*, 1983; Stoop *et al.*, 2012).

Los receptores V_2 se localizan principalmente en el riñón regulando la homeostasis osmótica, mientras que los receptores V_{1A} y V_{1B} se expresan en la periferia y en el sistema nervioso central. Se ha observado que áreas cerebrales como la adenohipófisis, el PVN del hipotálamo, la amígdala y el cerebelo (Hernando *et al.*, 2001) expresan el receptor V_{1B} . La expresión del receptor V_{1A} se ha reportado de forma moderada en los ganglios basales, tronco encefálico y médula espinal, mientras que la unión prominente al receptor V_{1A} se ha observado en la formación hipocampal, bulbo olfatorio, neocórtex capa IV, lecho de la estría terminal o *Bed nucleus of the stria terminalis* (BNST), hipotálamo ventromedial, tálamo, VTA, sustancia nigra (parte compacta), colículo superior, rafe dorsal, núcleo del tracto solitario, núcleo olivar inferior, y LS (Yu *et al.*, 1996; Caldwell *et al.*, 2008).

El LS es un núcleo de relevo de información que puede modular diferentes conductas mediante el aumento o disminución del tono inhibitorio y, de esta manera, es capaz de modular la DA en varios núcleos cerebrales que participan en la generación de la conducta tipo adictiva, incluyendo el cuerpo estriado, la amígdala, la PFC y el Acb (Maeda y Mogenson, 1981; Onteniente *et al.*, 1987; Louilot *et al.*, 1989). Neuroanatómicamente el LS se encuentra organizado en tres regiones, el LSD, el septum lateral intermedio (LSI) y septum

lateral ventral (LSV) (Paxino y Watson, 2009). Además, presenta un tono inhibitorio basal, debido a la existencia de interneuronas en el LS y neuronas GABAérgicas de proyección (Alonso y Frotscher, 1989; Risold y Swanson, 1996). Éste tono inhibitorio, es modulado por las proyecciones vasopresinérgicas provenientes principalmente del PVN y el SON, que sintetizan la AVP (Barker *et al.*, 1971; Pittman *et al.*, 1981; Armstrong *et al.*, 1982). Además, estructuras extrahipotalámicas como el BNST y la amígdala medial (MeA), también sintetizan y liberan AVP y proyectan al LS (De Vries *et al.*, 1984; Caffé *et al.*, 1987).

En este contexto, estudios electrofisiológicos han demostrado que la AVP activa un 40% de las neuronas del LS por medio del receptor V_{1A} . Luego de esta excitación se observó una posterior inhibición de las neuronas GABAérgicas en este núcleo (Raggenbas *et al.*, 2008), planteando la posibilidad de que la AVP excitara a las interneuronas del LS con una posterior inhibición de las neuronas de proyección. Esto demuestra que el sistema vasopresinérgico no solo sinapta con el LS, sino que también puede modular el carácter inhibitorio de éste núcleo (Raggenbas *et al.*, 2008). En concordancia con esto, en el laboratorio hemos observado que al administrar AVP en el LS, incrementa la liberación de GABA en este núcleo (Tobar, 20118). Por otro lado, observamos que una dosis aguda de AMPH (1.5 mg/kg i.p) produce una disminución de los niveles de AVP en el LS (Ahumada *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha demostrado que el efecto intracerebroventricular, del antagonista del receptor V_{1A} , disminuye la conducta de juego social (recompensante natural) en ratas machos juveniles (Veenema *et al.*, 2013). Sin embargo, frente al antagonismo intra-LS del receptor V_{1A} , se observó una mejora de la conducta de juego social, demostrando la relación del receptor V_{1A} en el LS con el circuito de la recompensa (Bredewold *et al.*, 2014). Todo esto hace que el LS sea considerado un núcleo de relevancia experimental.

Por lo tanto, ésta conexión neuroanatómica entre el sistema vasopresinérgico y el LS, podría tener una implicancia en la modulación de conductas tipo adictivas (Godino y Renard, 2018). Teniendo en cuenta que la AMPH disminuye el contenido de AVP en el SL, y que el SL presenta una alta densidad de receptores V_{1A} que al ser activados generan un aumento del tono inhibitorio, pensamos que la administración de AVP en éste núcleo podría modular la liberación de DA en el Acb y de esta manera modular las conductas tipo adictivas.

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se ha planteado anteriormente, las proyecciones GABAérgicas desde el LS que sinaptan con las interneuronas GABA del VTA y del Acb podrían participar en la modulación de las neuronas dopaminérgicas y así afectar la conducta de condicionamiento a AMPH. El LS expresa una alta densidad de receptores V_{1A} que al ser activados generan un aumento del tono inhibitorio de éste núcleo con una posterior inhibición de neuronas GABAérgicas, posiblemente de proyección. Además, la AMPH, droga de abuso, disminuye los niveles de AVP en el LS. Por lo tanto, AVP a través de la activación del receptor V_{1A} , podría aumentar el tono inhibitorio del LS y, en consecuencia, modular la liberación de DA en el Acb, principal blanco neuroanatómico de las drogas de abuso. Entonces, nos surge la siguiente pregunta de investigación: ¿En animales condicionados a AMPH, la microinyección de AVP en el LS es capaz de inhibir el condicionamiento a AMPH regulando, a su vez, el circuito de la recompensa?

Bajo este contexto planteamos la siguiente hipótesis:

2.1 Hipótesis

“La microinyección de AVP en el LS de ratas condicionadas a AMPH, disminuye el condicionamiento a la AMPH y la actividad neuronal en el Acb, aumentando el tono GABAérgico y disminuyendo el tono dopaminérgico en éste núcleo”.

2.2 Objetivo general

- ✓ Determinar si la microinyección de AVP en el LS de ratas condicionadas a AMPH, modula la conducta tipo adictiva.

2.3 Objetivos específicos:

En ratas condicionadas a AMPH y microinyectadas con AVP en el LS:

- 1.- Determinar la preferencia al lugar condicionado a AMPH.
- 2.- Analizar la actividad neuronal en el Acb.
- 3.- Cuantificar los niveles extracelulares de DA y GABA en Acb.

III.- METODOLOGÍA

3.1 Bioética

Todos los experimentos y la manipulación de los animales se realizaron de acuerdo al protocolo ético establecido por el comité de ética de la Universidad de Santiago de Chile. Se realizaron los máximos esfuerzos para minimizar el sufrimiento y el número de animales que se utilizaron en cada grupo experimental (Fondecyt N° 11140065; Dra. Georgina Renard).

3.2 Animales de experimentación y condiciones de mantención

Se utilizaron ratas *Sprague Dawley* machos de 60 días, de aproximadamente 300 ± 50 g al inicio de los experimentos. Los animales fueron obtenidos del bioterio central de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se mantuvieron en grupos de tres en cajas de acrílico transparente de 20x20x40 cm, con un ciclo circadiano de 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad (luz encendida a las 08:00 AM) en una habitación con temperatura ($24 \pm 2^\circ$ C) y humedad (50%-60%) controlada, en la sala de mantención perteneciente al Centro de Investigación Biomédica y Aplicada (CIBAP) de la Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago de Chile. Todos los animales se mantuvieron con agua y comida (LabDiet®, Prolab RMH 3000, MO, USA) *ad libitum*.

El laboratorio donde se llevaron a cabo los experimentos estuvo aislado de ruidos ambientales externos. Se utilizaron diferentes grupos de animales para las pruebas conductuales y los experimentos con microdiálisis.

3.3 Drogas

- 1.- [Arg8]-Vasopresina (AVP), un agonista de los receptores V_{1A} (0.4 ng/ μ l) (sintetizado por la Dra. Fanny Guzmán de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso).
- 2.- (d(CH₂)₅₁, Tyr(Me)₂, Arg8)-Vasopresina (Ant V_{1A}), un antagonista selectivo para los receptores de V_{1A} (4 ng/ μ l) (Tocris Bioscience) (Bychowski *et al.*, 2013).
- 3.- Anfetamina sulfato (1.5 mg/kg disuelta en solución salina) i.p, (Laboratorios Chile LTDA).

Las concentraciones fueron elegidas según experimentos preliminares del laboratorio.

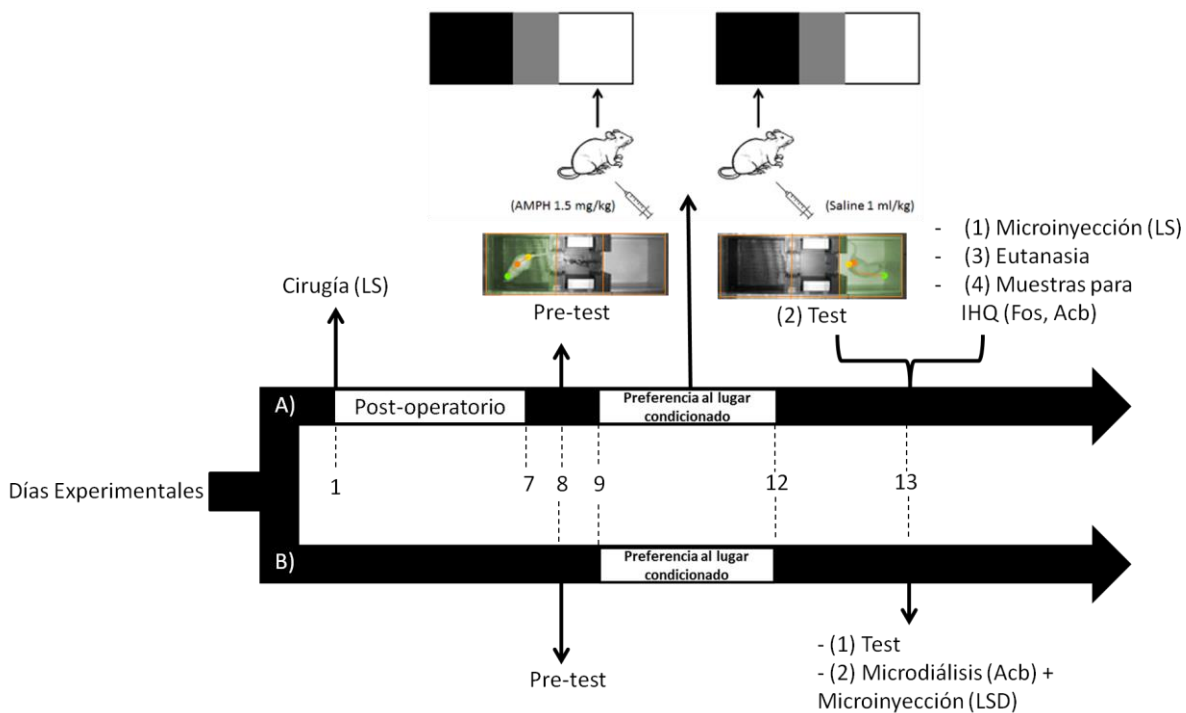
3.4 Diseño experimental

Para la realización de esta tesis se utilizaron 28 ratas *Sprague-Dawley* machos separadas aleatoriamente en dos grupos experimentales: (1) grupo condicionado a AMPH ($n = 25$) para pruebas conductuales e inmunohistoquímica (IHQ), a su vez este grupo se dividió en tres según **esquema 1**; y (2) un grupo condicionado a AMPH al que posteriormente se le realizó una microdiálisis en Acb con microinyección de AVP en LSD ($n = 3$) (**esquema 4**).



Esquema 4. Grupos experimentales. **A)** El grupo conductual de animales condicionados a AMPH se subdividió en 3 grupos a los cuales se les microinyectó (i) vehículo ($n=8$); (ii) AVP ($n=9$) o (iii) Ant V_{1A} + AVP ($n=8$) en el LSD previo al test. Además, a estos grupos se les realizó IHQ de Fos en tres planos del Acb, según el atlas Paxinos y Watson, (2009). Posteriormente se realizó el análisis histológico con el cual se verificó la posición de las cánulas en el LSD. **B)** Para los experimentos de microdiálisis, se condicionó a los animales a AMPH y luego se procedió a la realización de una microdiálisis en el Acb junto a una microinyección de AVP en el LSD ($n=3$). Posteriormente se realizó el análisis histológico con el cual se verificó la postura de la sonda y la posición de la cánula de microinyección.

En el **esquema 5** se presenta el diseño experimental utilizado en esta tesis:



Esquema 5. Diseño experimental. **A)** El Día Experimental (Exp) 1 se realizó la cirugía. Entre los Día Exp 1 y 7, período de post-operatorio, los animales fueron manipulados para minimizar el estrés al momento del procedimiento conductual. Luego, el Día Exp 8 se efectuó el pre-test. Después entre los Día Exp 9 y 12 se realizó el condicionamiento a AMPH según el protocolo de CPP. El Día Exp 13 se realizó la microinyección en el LSD, el test y la eutanasia de los animales y se obtuvieron los cerebros para la realización de las IHQ para Fos. **B)** En el segundo grupo de animales, el Día Exp 8 se realizó el pre-test, luego el Día Exp 9 comenzó el condicionamiento a AMPH y el Día Exp 13 se realizó el test y la microdiálisis en Acb junto con la microinyección en LSD de AVP.

3.5 Cirugía para el implante de cánulas guías

Los animales fueron anestesiados vía i.p con ketamina/xilacina en una dosis de 80 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Además, se les inyectó lidocaína en una dosis de 6 mg/kg, vía sub cutánea (s.c) la que fue inyectada en la zona del implante. Luego de colocar al animal en un aparato estereotáxico (Model 68002, RWD Life Science Co. Ltd, China), se procedió a limpiar la zona de incisión primero con una solución de clorhexidina gluconato al 2% y luego con una solución de etanol al 70%, lo que se repitió 5 veces. Se realizó una incisión en la piel, y una vez despejada y limpiada la zona de trabajo, se procedió a la localización de bregma como referencia, para luego realizar un agujero en el cráneo con un taladro (Dremel, Modelo 3000, México) según las coordenadas estereotáxicas calculadas con

ayuda del atlas Paxinos y Watson (2009). Luego se procedió a la implantación bilateral de cánulas guías (cánula simple/diámetro externo 0.64 mm-23G/M 3.5, RWD) en el LSD las que se fijaron al cráneo con tornillos de acero inoxidable y una mezcla de monómero auto curable con acrílico auto curable n° 66 (Duralay®, USA). Se utilizó el atlas de Paxinos y Watson (2009), para determinar la ubicación del LSD, implantando las cánulas guías 1 mm por sobre la zona de microinyección (**figura 1**). Se utilizaron las siguientes coordenadas para la implantación de las cánulas guías con un ángulo de inserción de 10°; AP: +0.1 mm, ML: ±1.7 mm, DV: -3.8 mm, referente a bregma. Para mantener la temperatura corporal del animal a 37 °C, se utilizó una manta calefactora eléctrica controlada por un termostato durante la cirugía. Después de la cirugía los animales fueron llevados a la sala de recuperación donde se mantuvieron con una manta calefactora eléctrica controlada por un termostato. Luego, los animales se mantuvieron 7 días en recuperación, administrando antibióticos y analgésicos durante tres días cada 24 hrs (enrofloxacino 5% en una dosis de 5 mg/kg, meloxicam en una dosis 2 mg/kg y solución de suero fisiológico (1 ml/kg)).

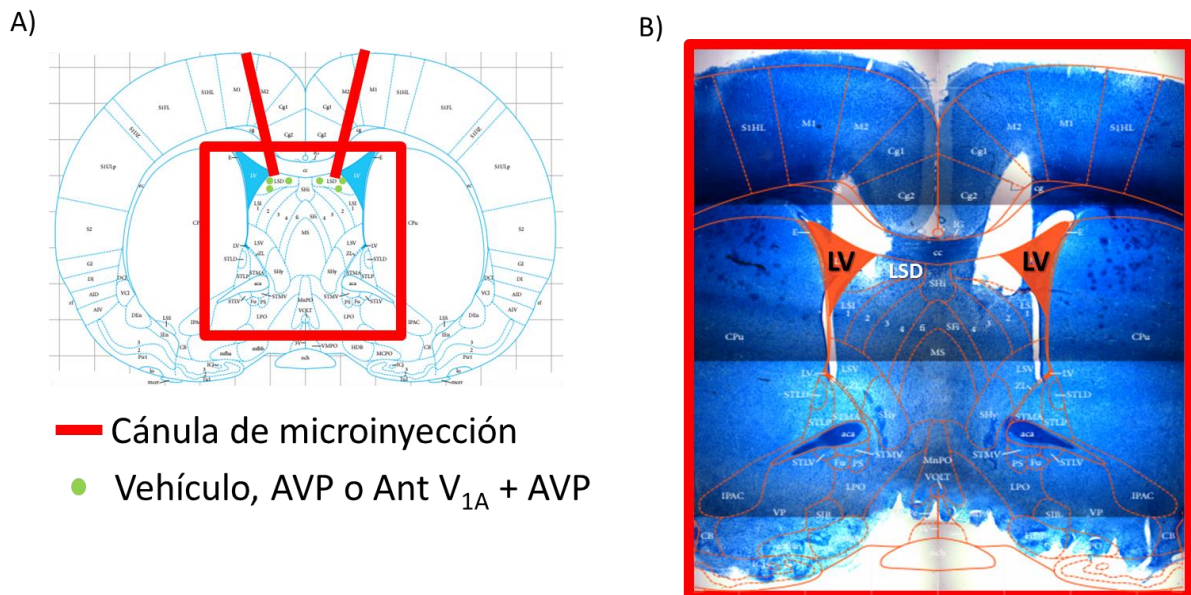


Figura 1. Zona de implante cánulas. **A)** Plano + 0.1 (referente a bregma) del atlas Paxinos y Watson (2009), en que se muestra el lugar donde fueron implantadas las cánulas en el LSD, y posteriormente se microinyectó vehículo, AVP o Ant V_{1A} + AVP. **B)** Acercamiento del panel A), donde se observa la marca de las cánulas en el LSD marcado con bordes rojos.

3.6 Protocolo de preferencia de lugar condicionado a AMPH

Se procedió a colocar la caja con los animales una hora antes de iniciar cada procedimiento en la sala donde se realizaron los experimentos conductuales.

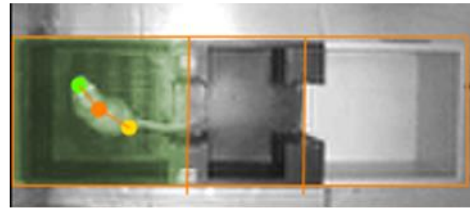
Luego del periodo de recuperación, los animales fueron sometidos al protocolo de CPP a AMPH el cual fue adaptado desde Kotlinska y colaboradores (2012).

La caja del protocolo de CPP, consiste en tres compartimientos: (i) una caja blanca, (ii) un pasillo neutral y (iii) una caja negra (**figura 2**). Los compartimientos fueron iluminados de la siguiente manera: 20 lux para la caja blanca, ≤ 5 lux para el pasillo neutral y ≤ 1 lux para la caja negra.

El protocolo de CPP consistió de tres fases. (1) Fase de pre-test, en donde el animal fue sometido a una prueba en ausencia de la droga. En esta fase el animal pudo explorar libremente todos los compartimientos del aparato durante 15 minutos y se determinó la preferencia basal de los animales por los distintos compartimientos. Para determinar la preferencia basal de permanencia en los compartimientos se procedió a cuantificar el tiempo de permanencia, en segundos, en cada uno de ellos mediante el programa ANY-Maze® (Stoelting Co., Illinois, USA).

Al día siguiente, comenzó la fase (2) o fase de condicionamiento, los animales recibieron durante 4 días una inyección de suero fisiológico 0.9% (1 ml/kg) y luego fueron confinados al compartimiento negro durante 60 minutos. Este procedimiento generó un control para evitar que sólo la inyección pudiese generar un condicionamiento. Cuatro horas después de recibida la inyección de salino, los animales recibieron durante 4 días una dosis diaria de AMPH (1.5 mg/kg) por vía i.p. Inmediatamente después de cada inyección de AMPH los animales fueron confinados durante 60 minutos en el compartimiento blanco (usualmente el de menor preferencia basal). (3) Al día siguiente de finalizada la fase de condicionamiento se realizó el test de 15 minutos en ausencia de AMPH para cuantificar el tiempo que pasaron los animales en el compartimiento asociado a la droga. Para esto se cuantificó el tiempo de permanencia en el compartimiento blanco en segundos. Para el análisis del condicionamiento a AMPH se utilizó el tiempo de permanencia en el lado blanco el día del test, comparado con el tiempo de permanencia en el lado blanco el día del pre-test. Un aumento significativo del tiempo de permanencia en el lado blanco (asociado a la droga) el día del test indica que los animales se condicionaron a AMPH.

A) ≤ 1 lux B) ≤ 5 lux C) 20 lux



Negro Neutro Blanco

Figura 2. Caja de CPP. **A)** Compartimiento negro iluminado con un máximo de ≤ 1 lux. **B)** Pasillo neutral iluminado con un máximo de ≤ 5 lux. **C)** Compartimiento blanco iluminado con 20 lux.

3.7 Protocolo de microinyección

Dos minutos antes de la tercera fase del protocolo de CPP se insertaron dos cánulas de microinyección (RWD Life Science Co. Ltd, China) bilateralmente 1 mm más larga que la cánula guía. Estas estaban conectadas a una jeringa manipulada por una bomba de microperfusión automatizada (Model 210 RWD, RWD Life Science Co. Ltd, China) a un flujo de 0.5 μ l/minuto. Luego se procedió a microinyectar: (1) vehículo (solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa), que contiene; 2.7 mM de KCl, 147 mM de NaCl, 0.85 mM de MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, pH 7.4); (2) una solución de AVP en LCRa (0.4 ng/ μ l); (3) solución de Ant V_{1A} (4 ng/ μ l), + AVP (0.4 ng/0.5 μ l) en LCRa.

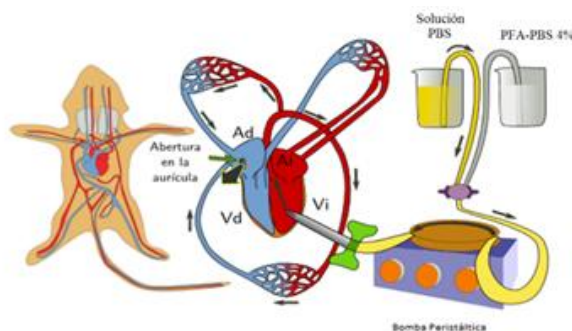
Bajo este procedimiento el animal siempre estuvo en libre movimiento. Una vez finalizada la microinyección, se esperó 1 minuto antes de retirar las cánulas de microinyección para evitar que las soluciones regresaran por capilaridad. Luego se comenzó la tercera fase del protocolo de CPP.

3.8 Fijación del tejido para IHQ

Dos horas luego de finalizada la microinyección, los animales fueron anestesiados con una solución de isoflurano vía inhalatoria. Luego se procedió a perfundir transcárdialmente con una solución buffer fosfato (PBS) (PBS 0.01 M: NaCl (80 g/l), KCl (2 g/l), NaH₂PO₄·7H₂O (27.7 g/l), KHPO₄ (2.7 g/l), pH 7.4), para luego continuar con una solución de fijación con paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.0 (PFA-PBS) (**esquema 6**). Este procedimiento se realizó con una bomba peristáltica (Gilson, modelo minipls II, Francia). Una

vez obtenidos los cerebros, se fijaron 24 hrs en solución PFA-PBS y fueron almacenados a 4 °C. Después de cumplidas las 24 hrs de post fijación, los cerebros fueron almacenados en una solución con PBS-sacarosa al 30% (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) y azida al 0.002% (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) durante 3 días a 4 °C.

Las inmunorreacciones se realizaron en secciones de 40 µm en libre flotación. Las secciones coronales se obtuvieron usando un criostato (modelo CM 1510-1, Leica) y con la guía del atlas Paxinos y Watson (2009) se seleccionaron secciones coronales que contuvieran el Acb.



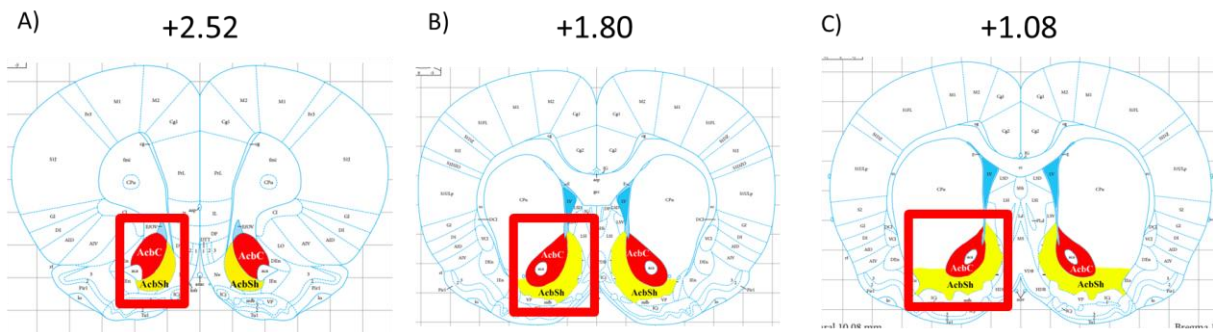
Esquema 6. Esquema representativo de la metodología que se utilizó en la perfusión transcardial.

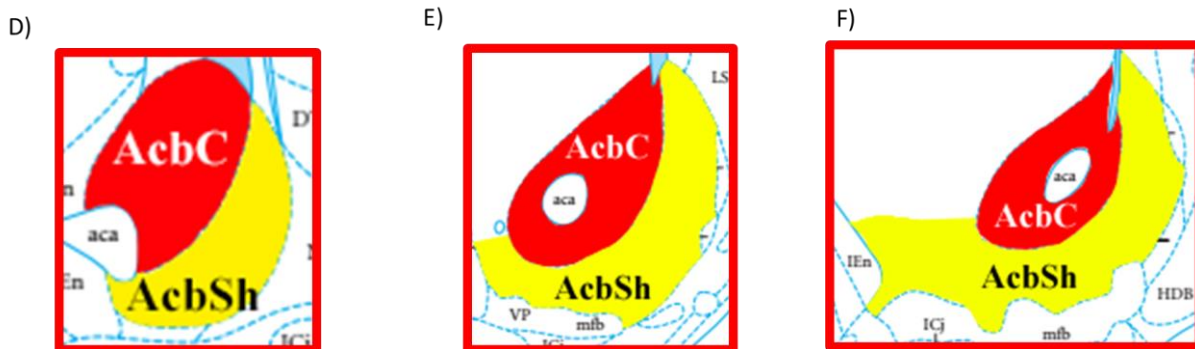
3.9 IHQ Fos

Las secciones coronales seleccionadas se colocaron en una solución de H₂O₂ al 3% en PBS (0.01 M) durante 10 minutos para bloquear la peroxidasa endógena. Luego se procedió a realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS. Posteriormente, los cortes se incubaron en una solución de bloqueo que contenía suero de caballo normal al 3% y tritón al 0.2% (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) disuelto en PBS, durante 1 hora, para bloquear sitios de unión inespecífica. Después los cortes fueron incubados durante 24 hrs con el anticuerpo primario policlonal anti-Fos (1:1000) (hecho en conejo) (Santa cruz Biotechnology, Chile) en solución de bloqueo a una temperatura de 4 °C. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS. Luego los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (1:1000) (anti-conejo) (Vectastain®, USA) en una solución de suero de albumina bovina al 1% (BSA) (Rockland Immunochemicals Inc, Limerick, PA 19468) en PBS durante 2 hrs. Luego las secciones coronales fueron colocadas en una solución de amplificación avidina biotina-peroxidasa (Vectastain® ABC kits, Vector, USA) (1:500) en PBS durante 1 hr. Después se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno

con PBS y un lavado de 10 minutos con una solución tris-buffer (tris-ácido 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6). La inmunorreactividad de Fos fue detectada con una solución de revelado intensificada con clorhidrato de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (0.5 mg/ml, Ni 0.25% y H₂O₂ 0.01125%) en tris-buffer, pH 7.6 durante 10 minutos. Una vez terminado el proceso se observó una tinción de color plomo. Luego se realizó un lavado con solución tris-buffer, pH 7.6, durante 10 minutos seguido de dos lavados con PBS durante 10 minutos cada uno. Todo el procedimiento descrito se llevó a cabo a temperatura ambiente (exceptuando la incubación del anticuerpo primario, como se indica en el texto) y en agitación suave. Finalmente, los cortes se montaron con gelatina al 0.5% (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) en portaobjetos, secados al aire y cubiertos con pegamento de montaje (Entellan® Nuevo, Darmstadt, Alemania) y cubreobjeto.

La visualización microscópica del tejido permitió, en primer lugar, analizar el patrón espacial de la inmunorreactividad, que luego se analizó mediante un sistema de video-microscopía y una computadora con un programa de cuantificación llamado ImageJ (NIH, EE. UU.). El conteo de las marcas fue realizado manualmente. Para esto se procedió a seleccionar tres planos del Acb, según el atlas Paxinos y Watson (2009): (1) rostral (referencia, bregma +2.52 mm); (2) medial (referencia bregma +1.8 mm); (3) caudal (referencia bregma +1.08 mm), por cada animal. Posteriormente se procedió a limitar la zona de análisis: en (i) AcbC y (ii) AcbSh, en los cuales se realizaron los conteos de los puntos inmunorreactivos para Fos (**esquema 7**).





Esquema 7. IHQ para Fos. Planos de bregma elegidos para la cuantificación de Fos según atlas Paxinos y Watson, 2009. **A)** Bregma +2.52 plano 1, **B)** Bregma +1.80 plano 2 y **C)** Bregma +1.08 plano 3 **D, E, F)** Acercamiento de los paneles **A, B** y **C** de las zonas de cuantificación en el AcbC y AcbSh de los planos 1, 2 y 3 respectivamente.

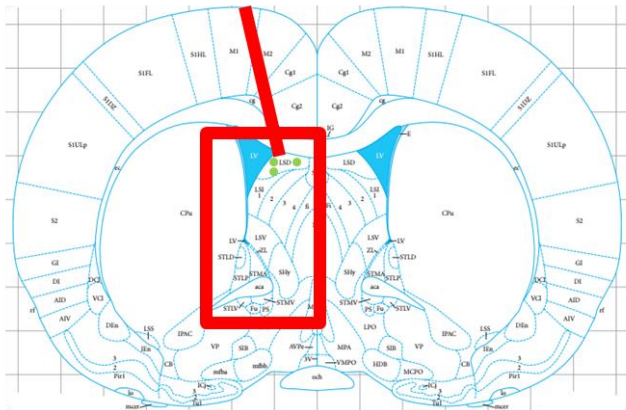
3.10 Microdiálisis *in vivo* en animales anestesiados

Previamente a la microdiálisis los animales fueron condicionados a AMPH, tal como se describe en el apartado 3.6.

Para el procedimiento de microdiálisis se colocaron los animales en un aparato estereotáxico (Model 68002, RWD Life Science Co. Ltd, China). Los animales fueron anestesiados vía i.p con uretano (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) con una dosis de 1.0 g/kg. Se procedió a la implantación unilateral de una cánula guía (cánula simple/diámetro externo 0.64 mm-23G/M 3.5, RWD) en el LS, la cual se fijó al cráneo con tornillos de acero inoxidable y una mezcla de monómero auto curable con acrílico auto curable nº 66 (Duralay®, USA). Se utilizó el atlas de Paxinos y Watson (2009) para determinar la ubicación del LSD, implantando la cánula guía 1 mm sobre el LSD. Se utilizaron las siguientes coordenadas para la implantación de la cánula guía con un ángulo de inserción de 20°; AP: +0.1 mm, ML: ± 2.6 mm, DV: -3.0 mm, referente a bregma. Luego se procedió a la inserción de una sonda para microdiálisis (tamaño del poro de membrana 20 KDa MWCO, longitud de membrana 2 mm, diámetro de la membrana 0.5 mm, CMA) en el Acb. Las coordenadas utilizadas según el atlas Paxinos y Watson (2009) fueron AP: +1.5 mm, ML: ± 1.5 mm, DV: -7.9 mm respecto a bregma y un ángulo de inserción de 0°. La sonda de microdiálisis fue microperfundida durante todo el procedimiento con LCRA, por medio de una jeringa empujada con una bomba de microperfusión (Model 210 RWD, RWD Life Science Co. Ltd, China) con un flujo de 2 μ l/minuto en Acb. Se procedió a esperar el tiempo de estabilización

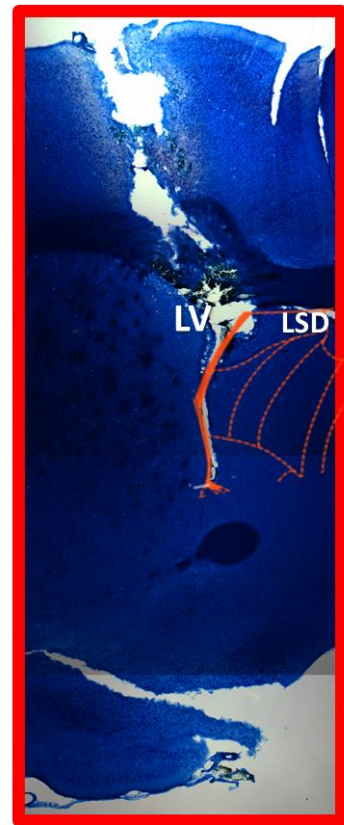
de 1 hora y 40 minutos (**figura 3**) y se continuó con la recolección de las muestras de microdializado, las que se recolectaron en HClO_4 (0.02 M). Primero se recolectaron 3 muestras basales (B_1 , B_2 , B_3) cada 20 minutos. Después de terminar con el B_3 , se microinyectó una solución de AVP (0.4 $\text{ng}/\mu\text{l}$), durante 1 minuto, mediante una jeringa de microinyección, la cual estaba acoplada a una bomba de microperfusión (Model 210 RWD, RWD Life Science Co. Ltd, China) con un flujo de 0.5 $\mu\text{l}/\text{minuto}$. Paralelamente se continuó con la recolección de las muestras cada 20 minutos en el Acb (M_1 a la M_4). Para mantener la temperatura corporal del animal a 37 °C, se utilizó una manta calefactora eléctrica controlada por un termostato.

A)



- Cánula de microinyección
- Vehículo, AVP o Ant V_{1A} + AVP

B)



Luego, cada 20 minutos se procedió a la recolección de las muestras en el Acb. Luego de recolectar 3 muestras basales (B_3) se procedió con la microinyección de una solución de AVP (0.4 ng/ μ l) en el LSD y paralelamente se continuó recolectando las muestras de microdializado (M_1 a la M_4) en el Acb.

3.11 Tinción de secciones coronales

Para la verificación de la postura de la sonda de microdiálisis en Acb y la postura de las cánulas guías en LSD (**figura 3B y D, respectivamente**) se seleccionaron rebanadas que contuvieran los planos del Acb y el LS según el atlas Paxinos y Watson (2009). Las tinciones se realizaron en secciones de 50 μ m, las cuales se obtuvieron usando un criostato (model CM 1510-1, Leica) y que posteriormente fueron teñidas en libre flotación. Luego se procedió a colocar los cortes en una solución de azul de metileno 0.005 M (Winkler LTDA, Quillay, Valle Grande, Lampa, Santiago de Chile) más una gota de ácido acético al 10%, durante 3 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS 0.01 M durante 10 minutos cada uno. Todos los lavados fueron efectuados a temperatura ambiente y con agitación suave. Finalmente, los cortes se montaron con gelatina al 0.5% (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) en portaobjetos y luego secados al aire y cubiertos con pegamento de montaje (Entellan® Nuevo, Darmstadt, Alemania) y cubreobjeto para posterior visualización al microscopio.

3.12 Cuantificación de neurotransmisores

3.12.1 GABA

Para la cuantificación de GABA se realizó una reacción de derivatización en la que se utilizaron: (i) 20 μ l del microdializado, (ii) 4 μ l de buffer borato (pH 10.8), (iii) y 4 μ l de reactivo fluorogénico (20 mg de ortoftaldehido y 10 μ l de b-mercaptoetanol en 5 ml de etanol). Para la reacción de derivatización se esperó 90 segundos y se realizó la inyección de la muestra al sistema (Cromatografía líquida de alta eficacia) HPLC acoplado a detector fluorométrico. Los filtros se configuraron para una longitud de onda excitatoria de 350 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm.

El HPLC lo conforman: (1) una bomba isocrática (modelo PU-4180, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón), (2) una columna de fase reversa C-18 (Kromasil 3-4.6; Suecia), (3) y un detector fluorométrico (modelo FP-4025, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón). Se utilizó un gradiente isocrático para la separación de las muestras. La fase móvil contenía 0.1 M de

NaH₂PO₄ y 24% CH₃CN (pH 5.7) el cual fue bombeado a un flujo de 1 ml/min. Se observó un tiempo de retención para GABA de 13 minutos. El área del pico correspondiente a GABA se comparó con los estándares de referencia y se calcularon las concentraciones a través de una curva de calibrado realizada con un programa cromatográfico (ChromNAV 2.0, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón).

3.12.2 Dopamina

Para la cuantificación de DA se inyectaron 20 µl por cada muestra de microdializado en un sistema de HPLC acoplado a un sistema electroquímico compuesto por: (i) un inyector Rheodyne, una bomba cuaternaria (modelo PU-4189 plus, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón), una columna de fase reversa C-18 y un detector electroquímico (EICOM Electrochemical detector ECD-700) configurado a un potencial de oxidación de 750 mV. Para la determinación de DA se utilizó la siguiente fase móvil: 0.15 M de C₆H₈·7H₂O (ácido cítrico), 0.0008 M de C₈H₁₇NaO₄S (octil sulfato de sodio), 2,5% CH₃CN, 3% tetrahidrofurano, ajustado a pH 3, a un flujo de 0.2 ml/min. Las áreas de los picos correspondientes a DA en las muestras fueron comparadas con los estándares de referencia que se utilizaron para calcular las concentraciones de DA. Las concentraciones fueron determinadas por medio de una curva de calibrado realizada con un programa cromatográfico (ChromNAV, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón). El tiempo de retención para DA fue de 8.5 minutos.

3.13 Análisis estadístico

Para las pruebas conductuales de actividad locomotora y condicionamiento a AMPH se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías y posteriormente una prueba estadística *Sidark's* para el análisis entre los diferentes grupos.

Para el estudio sobre la inmunorreactividad de Fos, se realizó un ANOVA de 1 vía, y posteriormente se realizó una prueba estadística *Tukey's*, con la que se estableció las diferencias entre los diferentes grupos.

Para las microdiálisis se utilizó un análisis de varianza de 1 vía y posteriormente se realizó una prueba estadística *Dunnnett*, para analizar las diferencias entre los niveles basales de neurotransmisores y los niveles post-estímulo de neurotransmisores.

Todos los datos se presentaron como promedios ± error estándar medio (SEM). El

nivel de probabilidad menor o igual a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. Se utilizó el software GraphPad Prism 7 para realizar todos los análisis.

IV.- RESULTADOS

4.1 Efecto sobre el condicionamiento a AMPH luego de la microinyección de AVP en el LSD

En la **figura 4** se observa el efecto de la microinyección de AVP en el LSD sobre el condicionamiento a AMPH.

Al realizar el ANOVA de 2 vías del tiempo de permanencia en el lado blanco (TPLB) se observó un efecto significativo ($F(1,22) = 16.47$; $p = 0.0005$) de las pruebas (test y pre-test). No se observó un efecto significativo ($F(2,22) = 2.268$; $p = 0.1272$) del tratamiento ni tampoco de la interacción entre las variables analizadas ($F(2,22) = 1.655$; $p = 0.2140$).

Al realizar la prueba estadística *Sidark's* se observó que los animales del grupo vehículo aumentaron significativamente el TPLB (compartimento asociado a AMPH), el día del test comparado con el TPLB el día del pre-test ($p = 0.0093$).

Por el contrario, en los animales del grupo AVP no se observaron diferencias significativas en el TPLB el día del test, comparado con el día del pre-test ($p = 0.7131$). Finalmente, al igual que los animales del grupo vehículo, los animales del grupo Ant V_{1A} + AVP aumentaron significativamente el TPLB el día del test, comparado con el día del pre-test ($p = 0.0425$) (**figura 4**).

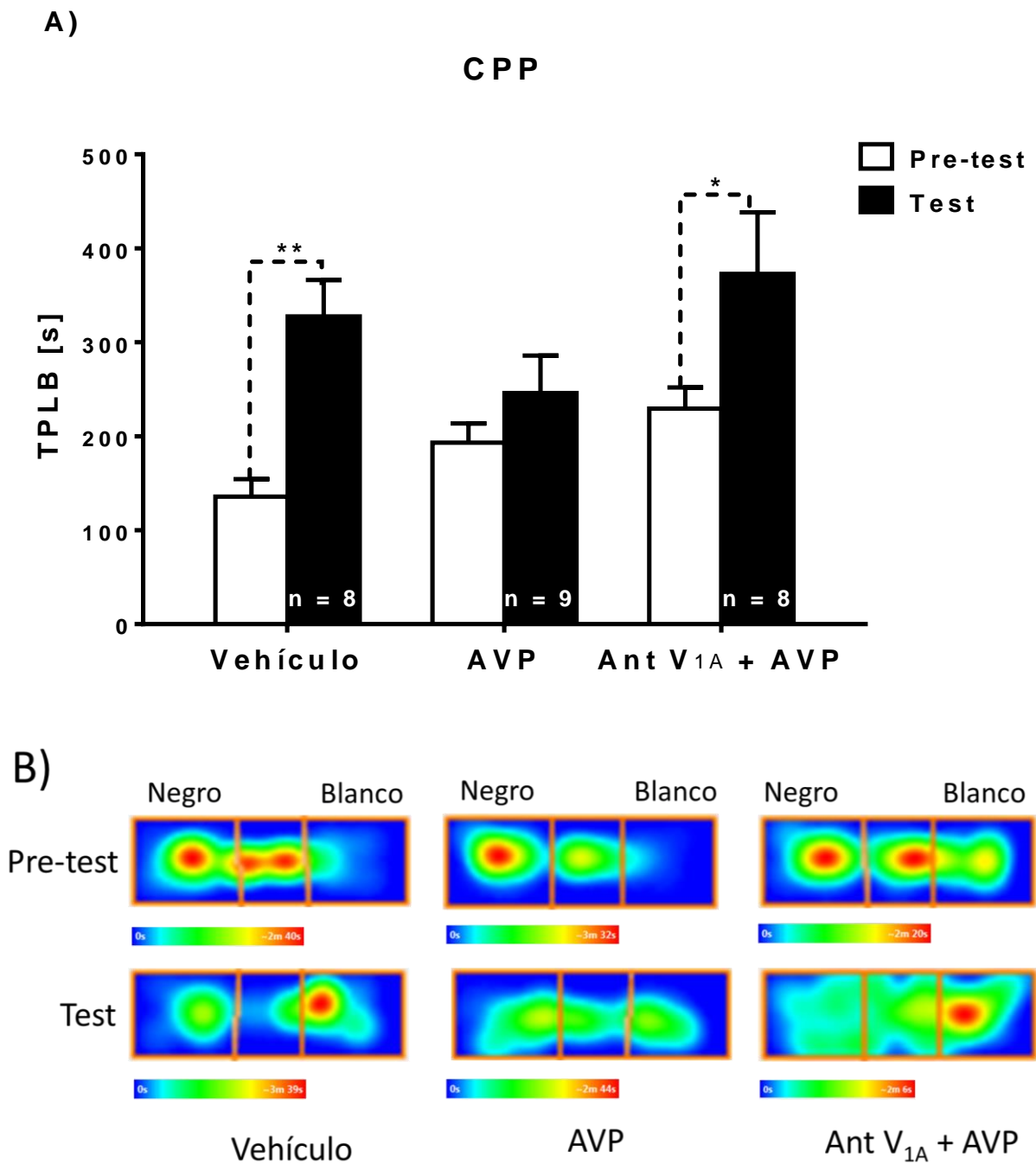


Figura 4. A) Efecto de AVP intra-LSD sobre el condicionamiento a AMPH donde se observa el tiempo de permanencia en el lado blanco (TPBL) en segundos, el día del pre-test (blanco) y el día del test (negro) en los grupos vehículo, AVP y Ant V_{1A} + AVP. Los datos están representados como media \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. **B)** Mapas de calor representativos de los animales microinyectados con vehículo, AVP y Ant V_{1A} + AVP en el tiempo de permanencia en los distintos compartimentos el día del pre-test y el día del test.

4.2 Efecto sobre la actividad locomotora luego de la microinyección de AVP en el LSD en animales condicionados a AMPH

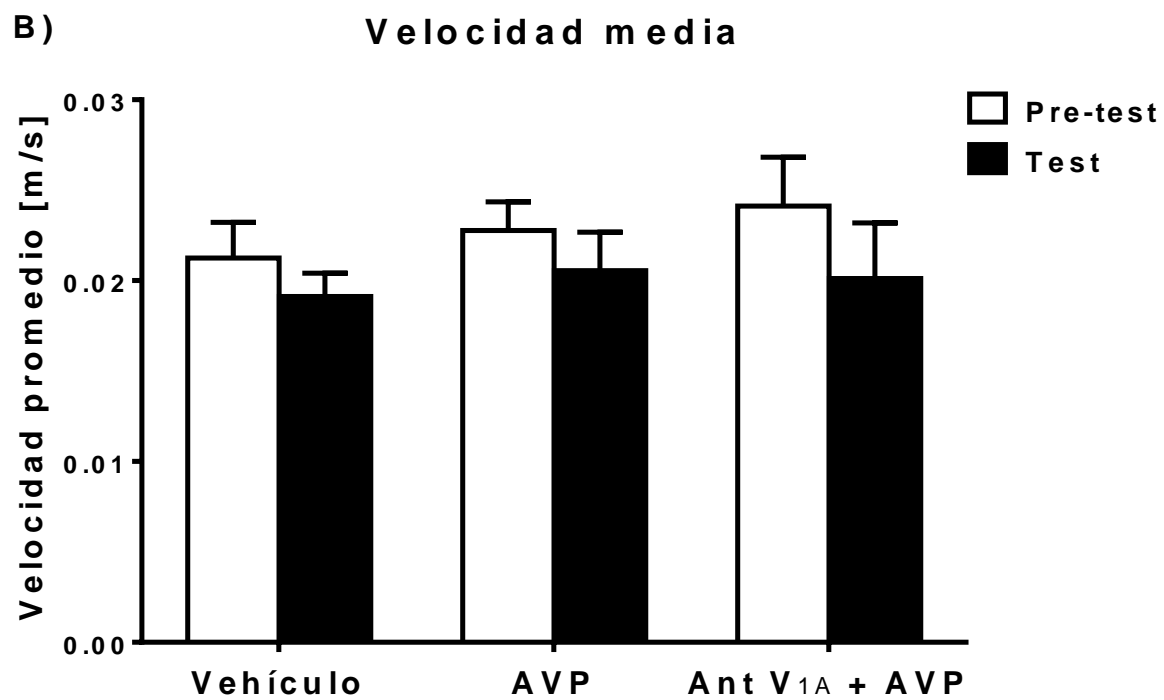
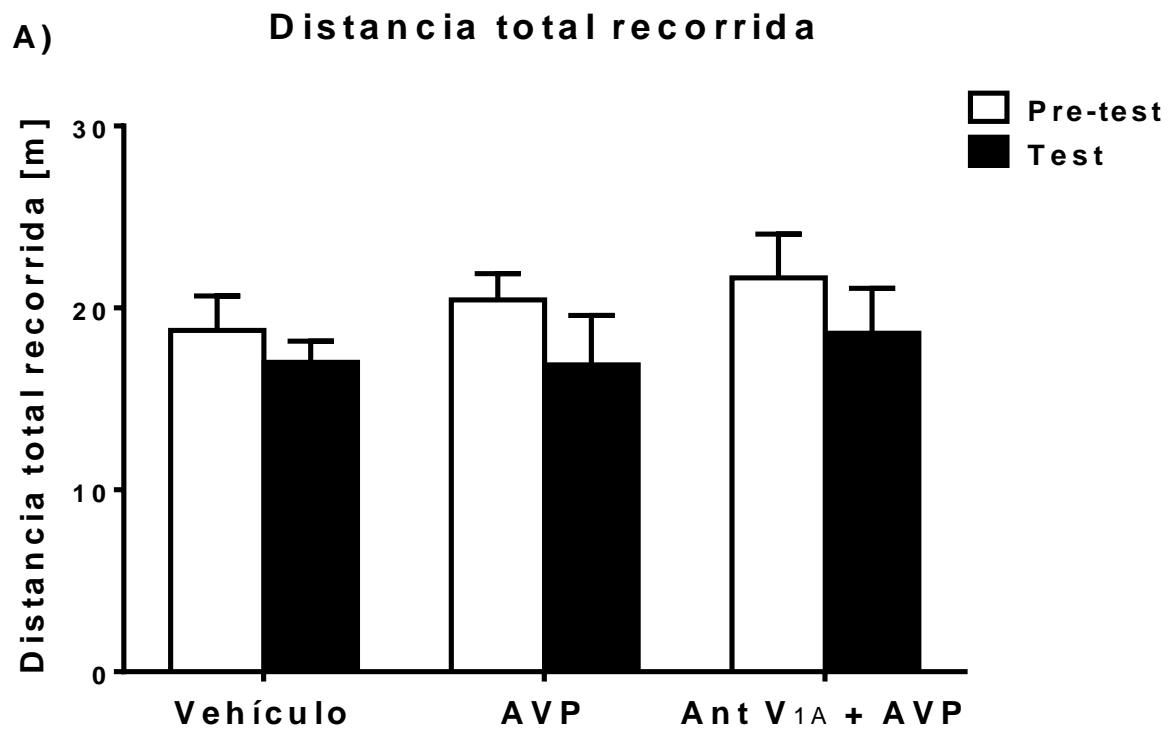
En la **figura 5** se observa el efecto de la microinyección de AVP en el LSD en los animales condicionados a AMPH sobre la actividad locomotora.

4.2.1 Distancia total recorrida

Al realizar el ANOVA de 2 vías de la distancia total recorrida, no se observaron efectos significativos de las pruebas (pre-test, test) ($F(1,46) = 3.6$; $p = 0.0641$), del tratamiento ($F(2,46) = 1.199$; $p = 0.3109$), ni de la interacción entre las variables analizadas ($F(2,46) = 0.2967$; $p = 0.7447$). Esto nos indica que los diferentes tratamientos realizados no afectaron la distancia total recorrida (**figura 5A**).

4.2.2 Velocidad media

Al realizar el ANOVA de 2 vías para el parámetro de la velocidad media, no se observaron efectos significativos de las pruebas ($F(1,46) = 3.309$; $p = 0.0754$), del tratamiento ($F(2,46) = 0.8311$; $p = 0.4420$), ni de la interacción entre los grupos experimentales y las pruebas realizadas, ($F(2,46) = 0.529$; $p = 0.5928$), indicando que los diferentes tratamientos realizados no afectaron la velocidad media (**figura 5B**).



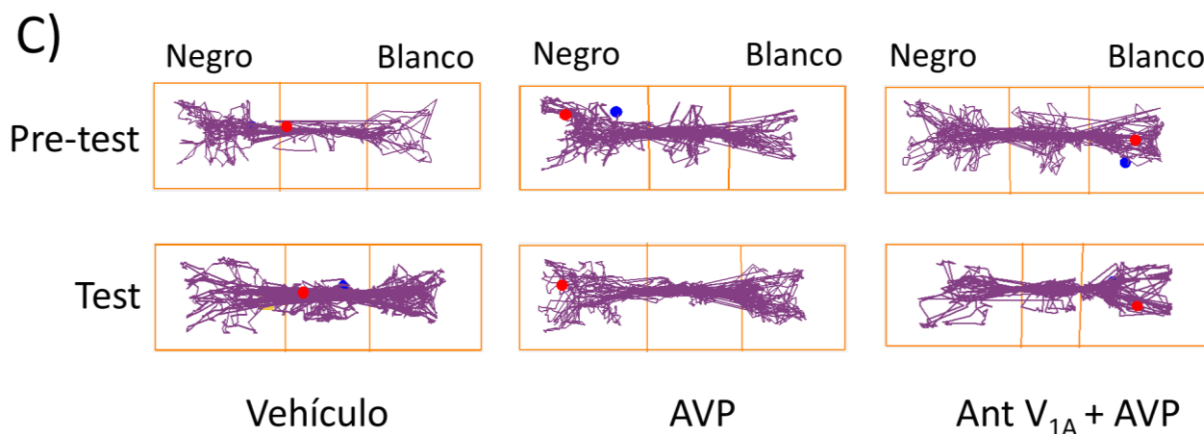


Figura 5. Efecto de AVP intra-LSD en animales condicionados a AMPH sobre la actividad locomotora. **A)** Distancia total recorrida expresada en metros (m). **B)** Velocidad media expresada en metros/segundo (m/s). **C)** Imagen representativa del rastreo de la distancia total recorrida de los animales microinyectados con vehículo, AVP y Ant V_{1A} + AVP el día del pre-test y el día del test. Los datos están representados como media \pm SEM.

4.3 Efecto sobre la actividad neuronal en Acb, luego de la microinyección de AVP en el LSD en animales condicionados a AMPH

Para el análisis de las IHQ en Acb, se utilizaron tres planos referentes a bregma según Paxinos y Watson (2009): (i) plano 1 (+2.52) (**figura 6A**), (ii) plano 2 (+1.80) (**figura 6B**), y (iii) plano 3 (+1.08) (**figura 6C**).

Para el plano 1 (**figura 6A**) en el AcbC, el ANOVA de 1 vía, mostró un efecto significativo del tratamiento sobre la inmunorreactividad Fos ($F(2,7) = 6.156$; $p = 0.0287$). Al realizar las comparaciones entre los tratamientos se observó una disminución significativa del número de neuronas inmunorreactivas a Fos en los animales microinyectados con AVP con respecto a los animales microinyectados con el vehículo ($p = 0.0542$). Además, se observó un aumento significativo del número de neuronas inmunorreactivas a Fos en los animales microinyectados con Ant V_{1A} + AVP comparado con los animales microinyectados con AVP ($p = 0.0440$).

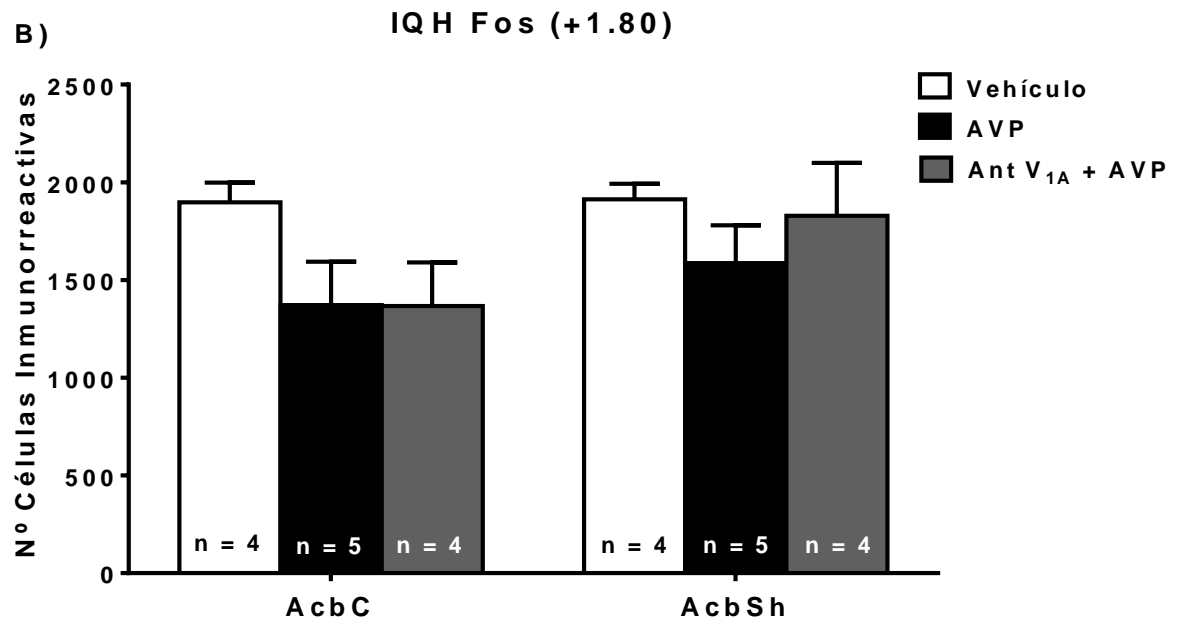
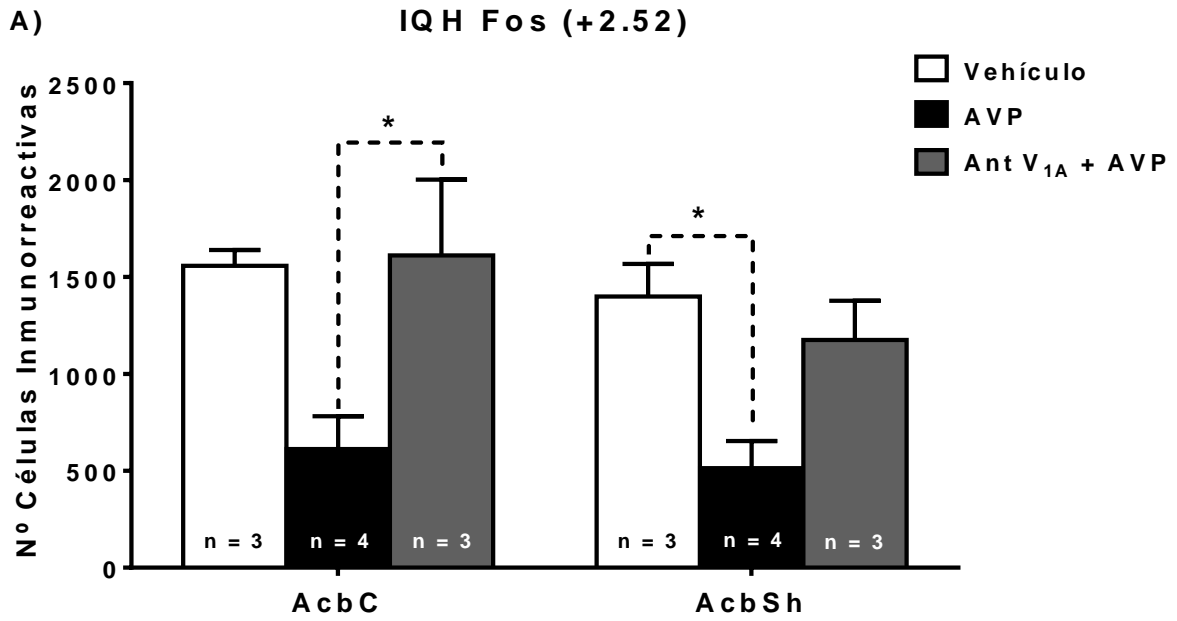
Luego al realizar el análisis en la región del AcbSh, el ANOVA de 1 vía, mostró un efecto significativo del tratamiento sobre la inmunorreactividad Fos ($F(2,7) = 8.129$; $p = 0.0150$). Al realizar las comparaciones entre los tratamientos se observó una disminución significativa del número de neuronas inmunorreactivas a Fos en los animales microinyectados con AVP con respecto a los animales microinyectados con el vehículo ($p = 0.0161$). Además,

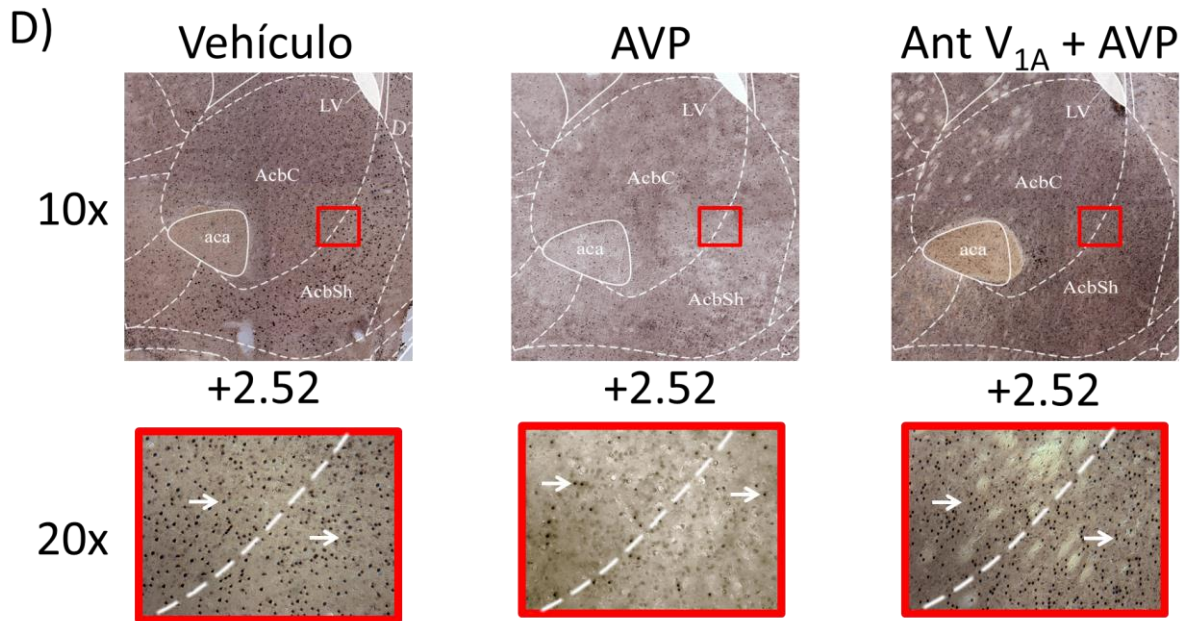
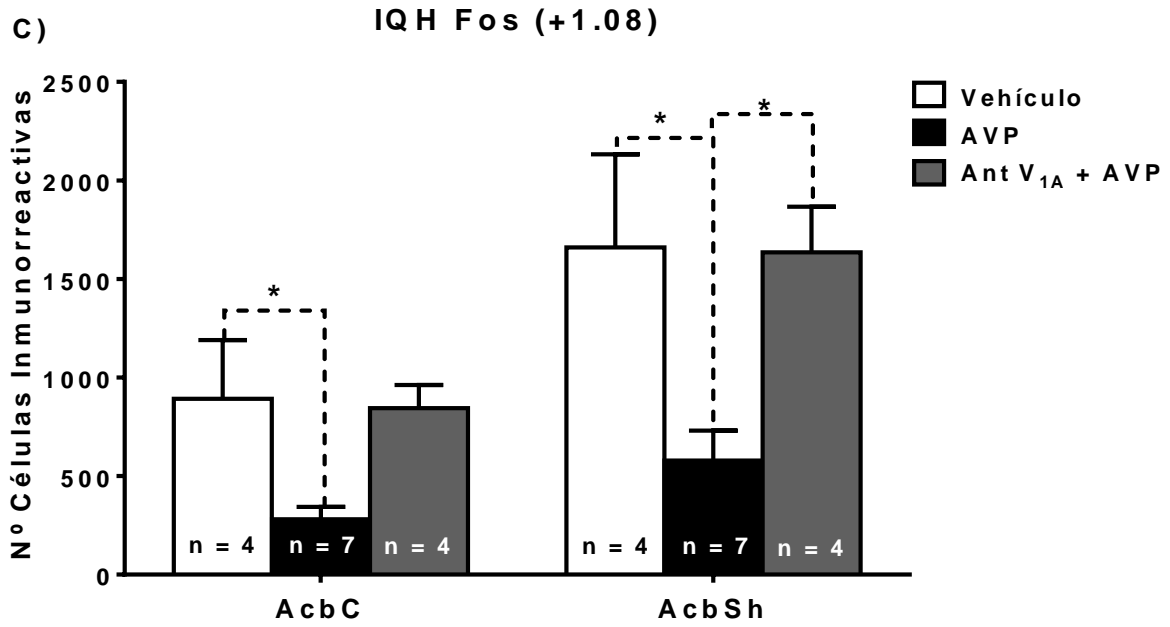
no se observó un aumento significativo del número de neuronas inmunorreactivas a Fos en los animales microinyectados con Ant V_{1A} + AVP comparado con los animales microinyectados con AVP ($p = 0.0576$).

En el plano 2 (**figura 6B**) en el AcbC, el ANOVA de 1 vía no mostró un efecto significativo del tratamiento sobre la inmunorreactividad Fos ($F(2,10) = 2,266$; $p = 0.1543$). Al igual que en el AcbSh el ANOVA de 1 vía no mostró un efecto significativo ($F(2,10) = 0,7717$; $p = 0.4879$).

Finalmente, en el plano 3 en el AcbC (**figura 6C**), el análisis de varianza de una vía mostró un efecto significativo del tratamiento sobre la inmunorreactividad de Fos ($F(2,12) = 5.581$; $p = 0.0193$). Luego al realizar las comparaciones entre los tratamientos se observó una disminución significativa entre los animales microinyectados con AVP, respecto a los animales microinyectados con vehículo ($p = 0.0352$). Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los animales microinyectados con Ant V_{1A} + AVP, respecto a los animales microinyectados con AVP ($p = 0.0523$).

Luego, al realizar el análisis de varianza de una vía, éste mostró en la región del AcbSh, un efecto significativo del tratamiento sobre la inmunorreactividad de Fos ($F(2,12) = 5.964$; $p = 0.0159$). Luego, al realizar las comparaciones entre los tratamientos se observó una disminución significativa entre los animales microinyectados con AVP, respecto a los animales microinyectados con vehículo ($p = 0.0341$). De igual forma, hubo diferencia significativa entre los animales microinyectados con Ant V_{1A} + AVP, respecto a los animales microinyectados con AVP ($p = 0.0383$).





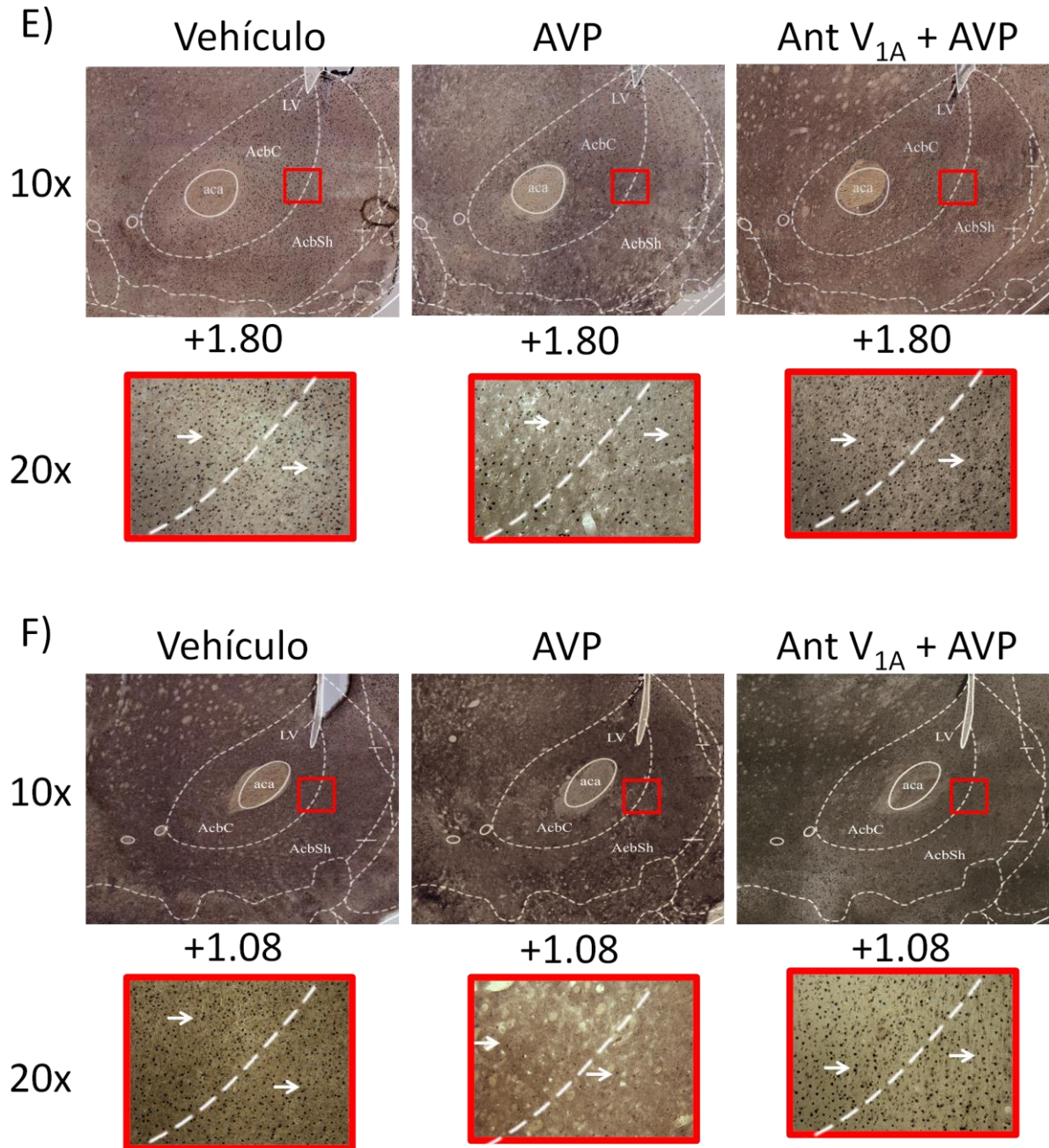


Figura 6. Efecto de AVP intra-LSD en animales condicionados a AMPH sobre la actividad neuronal medida a través del número de neuronas inmunorreactivas a Fos. **A)** Número de neuronas inmunorreactivas a Fos en el plano 1 (+2.52) referente a bregma del AcbC y AcbSh en los grupos de animales microinyectados con vehículo (blanco), AVP (negro) o Ant V_{1A} + AVP (gris). **B)** Número de neuronas inmunorreactivas a Fos en el plano 2 (+1.80) referente a bregma del AcbC y AcbSh en los grupos de animales microinyectados con vehículo (blanco), AVP (negro) o Ant V_{1A} + AVP (gris). **C)** Número de neuronas inmunorreactivas a Fos en el plano 3 (+1.08) referente a bregma del AcbC y AcbSh en los grupos de animales microinyectados con vehículo (blanco), AVP

(negro) o Ant V_{1A} + AVP (gris). **D) E) F)** Fotos representativas de la inmunorreacción de Fos, para los grupos microinyectados con vehículo, AVP y Ant V_{1A} + AVP en el LSD, vista 10X y 20X del Acb, donde se observa el plano 1, Bregma +2.52 (**D**); plano 2, Bregma +1.80 (**E**) y plano 3, Bregma, +1.08 (**F**). En la vista 20X las flechas blancas muestran las marcas que fueron consideradas para la cuantificación. Los datos están representados como media ± SEM. * $p < 0.05$.

4.4 Efecto de la microinyección de AVP en el LSD en animales condicionados a AMPH sobre los niveles extracelulares de DA y GABA en el Acb

En la **figura 7A y B** se observa el efecto de la microinyección de AVP en el LSD en animales previamente condicionados a AMPH (**figura suplementaria 1, apéndice**) sobre los niveles extracelulares de DA y GABA en el Acb, respectivamente.

4.4.1 Dopamina

El ANOVA de 1 vía de mediciones repetidas mostró un efecto significativo entre las muestras obtenidas ($F(6, 14) = 3.83; p = 0.0180$) (**figura 7A**).

Al realizar las comparaciones múltiples se observó una disminución estadísticamente significativa en las concentraciones extracelulares de DA en los minutos 80 y 100 respecto al minuto 60 (basal 3) en el Acb, luego de microinyectar AVP intra-LSD (flecha **roja**) ($p = 0.0231; p = 0.0247$).

4.4.2 GABA

El ANOVA de 1 vía de mediciones repetidas no mostró diferencias significativas entre las muestras obtenidas ($F(6, 14) = 2.984; p = 0.3101$) (**figura 7B**).

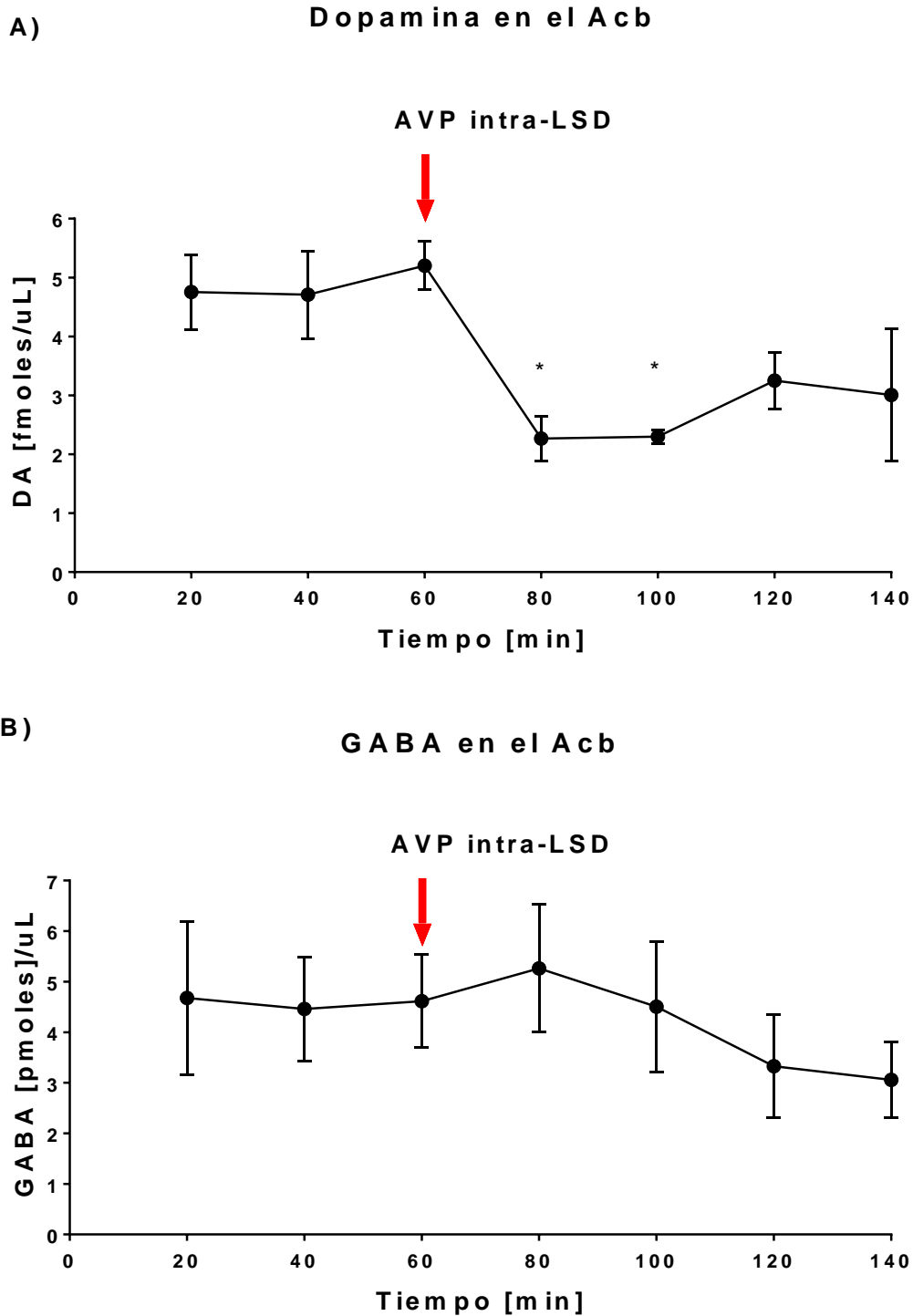


Figura 7. Efecto de AVP intra-LSD en animales condicionados a AMPH sobre los niveles extracelulares de Dopamina (**A**) y GABA (**B**) en el Acb. La flecha roja representa la microinyección de AVP en el LSD. Los datos fueron expresados en concentraciones [fmoles]/ μ L para DA y [pmoles]/ μ L para GABA. Cada punto en el gráfico representa la recolección de muestras durante 20 minutos. La microinyección de AVP (flecha roja) tuvo una duración de 1 minuto. Los datos están representados como media \pm SEM. * $p < 0.05$.

V.- DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la microinyección de AVP en el LSD de animales condicionados a AMPH, sobre la conducta tipo adictiva, la actividad neuronal y los niveles de neurotransmisores en el Acb. En este sentido, la relación neuroanatómica del LS, el cual expresa una alta densidad de receptores V_{1A} , y el Acb, podría ser clave en la modulación de este circuito, generando una disminución en el condicionamiento a AMPH. Como esperábamos, nuestros resultados mostraron que la microinyección de AVP en el LSD disminuyó el condicionamiento a AMPH y la actividad neuronal en el AcbC y el AcbSh. Además, la microinyección de AVP en el LSD luego del condicionamiento a AMPH, produjo una disminución de los niveles extracelulares de DA en Acb. Estudios han demostrado que la administración sistémica de AMPH, produce la activación de la porción caudal del LS del cual se proyectan neuronas GABAérgicas hacia el VTA, indicando que éste núcleo podría estar envuelto en los procesos de adicción a AMPH (Colussi-Mas *et al.*, 2007).

Nuestros resultados muestran que los animales tratados con AMPH generan la conducta de CPP a la droga, pero interesantemente, la microinyección intra-LSD de AVP disminuye el condicionamiento a AMPH. En esta línea, estudios han demostrado que la administración intracerebroventricular de AVP disminuye la auto-administración de cocaína (Vry *et al.*, 1988) y la administración s.c disminuye el desarrollo de la sensibilización conductual inducida por cocaína (Sarnyai *et al.*, 1991).

Además, se ha demostrado la existencia de una alta densidad del receptor V_{1A} en el LS (Tribollet *et al.*, 1988; Ostrowski *et al.*, 1992), indicando incluso que la activación de éste receptor excita un 40% de las neuronas de éste núcleo (Raggenbass *et al.*, 2008). La AVP genera un incremento del tono GABAérgico en el LS, que podría estar inhibiendo a las neuronas de proyección (Raggenbass *et al.*, 2008) que van desde el LSD (porción caudal) hacia el VTA (Luo *et al.*, 2011), permitiendo que la circuitería local del VTA libere más GABA y que en consecuencia disminuya el disparo de las neuronas dopaminérgicas de proyección que van hacia el Acb. Resultados previos de nuestro laboratorio, mostraron que la perfusión intra-septal por microdiálisis reversa de AVP produce un aumento de la liberación de GABA en el LS y una concomitante disminución de los niveles extracelulares de DA en el VTA (Tobar, 2018), lo que concuerda con nuestra hipótesis.

Es importante señalar que la AVP puede interactuar con los receptores de oxitocina, presentes en el LS (Flannelly *et al.*, 1986; Fleischer y Slotnick, 1978; Olazábal y Young, 2006). Estudios en hamsters Syrian han demostrado que la administración intracerebroventricular de oxitocina o AVP, mejora el reconocimiento social por medio de la unión de estos nonapéptidos al receptor de oxitocina y no al V_{1A} (Song *et al.*, 2016). Considerando esto, utilizamos un antagonista selectivo del receptor V_{1A} , para determinar si la AVP estaba actuando mediante éste receptor. La microinyección intra-LSD de un antagonista selectivo del receptor V_{1A} , junto con la AVP, nos permitió determinar que la acción de la AVP en el LS es mediada por el receptor V_{1A} , ya que observamos que los animales recuperaron la conducta de CPP a AMPH. Por lo tanto, los receptores de oxitocina no estarían implicados en la respuesta de la AVP sobre la activación de las neuronas GABAérgicas del LS. Estos hallazgos nos permiten decir que la activación de la circuitería local intra-LSD, es mediada por el receptor V_{1A} , y podría ser clave en la modulación de la conducta tipo adictiva.

Por otro lado, los resultados conductuales no muestran una alteración en la actividad locomotora, tanto en el pre-test como en el test, permitiendo descartar que una hiper o hipolocomoción hayan alterado los resultados del condicionamiento a AMPH. Liebsch y colaboradores (1996), demostraron que la microinyección de AVP en el área septal, modula los comportamientos tipo ansiosos, pero sin alterar la actividad locomotora en los animales, lo que concuerda con nuestros resultados.

Es conocido que la cocaína y la AMPH inducen de manera rápida y transitoria genes de expresión temprana, dentro de los cuales podemos encontrar c-fos, proporcionando información directa de que las drogas de abuso pueden influenciar profundamente la expresión de genes. En algunos casos, la transcripción de c-fos puede ser detectada dentro de los 5 minutos luego de la estimulación, pero normalmente la expresión es apagada en el nivel transcripcional luego de 1 hora. Sin embargo, el RNA mensajero (mRNA) de c-fos es inestable, y la persistencia del mRNA es de un máximo de 2 horas (Greenberg y Ziff, 1984; Müller *et al.*, 1984) Fos es el producto proteico del proto-oncogen c-fos y se expresa en respuesta a elevaciones inducidas por hormonas y neurotransmisores que inducen niveles intracelulares de calcio y cAMP (Morgan y Curran, 1991). La síntesis de Fos consigue un máximo de expresión aproximadamente 2 horas luego de realizado el estímulo (Müller *et al.*, 1984; Curran *et al.*, 1984).

En este sentido, los resultados del condicionamiento a AMPH se relacionan directamente con los resultados obtenidos en la expresión de Fos en el Acb. Luego de 2 horas de realizado el estímulo, la inmunorreactividad de Fos, permitió medir la actividad neuronal (Curran *et al.*, 1984; Greenberg y Ziff, 1984; Müller *et al.*, 1984; Nestler, 2012). El análisis de las zonas del AcbC y el AcbSh muestran una clara disminución en la actividad neuronal, en los animales microinyectados con AVP. Diversos estudios han demostrado que la inyección i.p de AMPH, genera un aumento de la inmunorreactividad de Fos en el Acb (Nestler, 2001; Renthal *et al.*, 2008; Robison y Nestler, 2011). Además, se ha demostrado que el contexto al que fue asociado la droga, también produce el aumento de la actividad neuronal en el Acb (Brown *et al.*, 1992; Neisewander *et al.*, 2000; Ciccocioppo *et al.*, 2001; Miller y Marshall, 2005; Rademacher *et al.*, 2006).

El análisis detallado del gradiente rostro-caudal de la inmunorreactividad Fos en AcbC y AcbSh mostró, en el plano 1 y en el plano 3, una clara disminución de la actividad neuronal en estas zonas, en los animales microinyectados con AVP respecto a los animales microinyectados con vehículo y con Ant V_{1A} + AVP. Sin embargo, en el plano 2 no se observaron diferencias en la inmunorreactividad de Fos entre los distintos grupos de animales. Esto podría estar vinculado, posiblemente, a la relación neuroanatómica que tiene el LS con la zona rostral del Acb (plano 1), y la relación que tiene el VTA con la zona caudal del Acb (plano 3) (Powell y Leman, 1976). Considerando que las proyecciones del LS al Acb son posiblemente hacia la zona rostral de este núcleo y que las proyecciones dopaminérgicas desde el VTA son más abundantes hacia la zona caudal del Acb (Hökfelt *et al.*, 1980; Phillipson *et al.*, 1985; Meidahl *et al.*, 2016), es posible que la zona central del Acb no se vea influenciado por la acción de la AVP en el LS, ni por la disminución de la actividad de las neuronas dopaminérgicas de proyección provenientes del VTA.

En cuanto a los experimentos de microdiálisis, estos se realizaron bajo el contexto del condicionamiento a AMPH. La disminución de los niveles extracelulares de DA en el Acb, luego de la microinyección intra-LSD de AVP, se correlacionan con los resultados obtenidos en las pruebas conductuales y la actividad neuronal en el Acb. En este sentido, probablemente la microinyección de AVP intra-LSD, estaría actuando mediante las proyecciones GABAérgicas que se dirigen hacia el VTA, y la disminución significativa de los niveles

extracelulares de DA en el Acb corresponda a una disminución de la actividad dopaminérgica en el VTA como se observó en experimentos previos del laboratorio (Tobar, 2018).

Hemos observado que la AVP está actuando sobre los receptores V_{1A} del LS. Sin embargo, la localización exacta en las neuronas del LS de estos receptores es desconocida, pudiendo estar presentes tanto en las interneuronas y/o neuronas de proyección del LS. Sin embargo, nuestros resultados nos permiten una ventana especulativa sobre su ubicación. Los receptores V_{1A} , podrían estar ampliamente expresado en los terminales axónicos de las interneuronas de la circuitería local del LSD. En este sentido, si el receptor V_{1A} estuviese expresado en las interneuronas del LSD, es muy probable que la activación del receptor V_{1A} estuviese aumentando el tono GABAérgico de éste núcleo disminuyendo el tono GABAérgico de las neuronas de proyección hacia el VTA. Estas neuronas de proyección sinaptan con las interneuronas GABAérgicas del VTA (Luo *et al.*, 2011), las cuales modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el Acb (Phillipson y Griffiths, 1985; Le Moal y Simon, 1991). Por lo tanto, el aumento de la liberación de GABA por las interneuronas del VTA, estaría disminuyendo la probabilidad de disparo de las neuronas de proyección dopaminérgicas hacia el Acb.

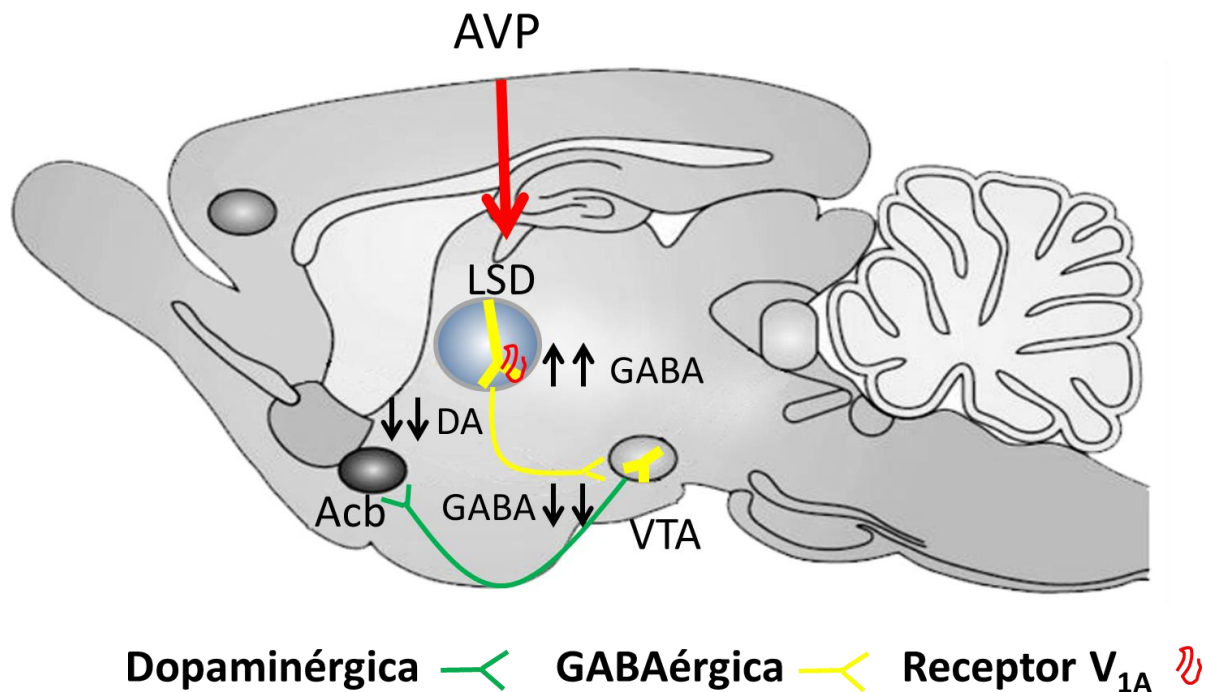
Por otro lado, la hipótesis planteada se cumple parcialmente. Considerando que variados trabajos sobre el LS han demostrado la existencia de neuronas GABAérgicas que proyectan directamente hacia el Acb (Jonsson *et al.*, 2015), esperábamos que los niveles extracelulares de GABA en el Acb aumentarían luego de la microinyección de AVP en el LSD. Sin embargo, no observamos este aumento, lo que apoya nuestra especulación anterior con respecto a la vía LS-VTA-Acb. Esto también apoya la idea de que el receptor V_{1A} se encuentra localizado en las interneuronas del LSD, como se explicó anteriormente.

Por lo tanto, es muy probable que la zona escogida para la microinyección de AVP en el LSD caudal, presente una relación neuroanatómica más potente con núcleos como el VTA y en menor grado con el Acb (Powell y Leman, 1976; Luo *et al.*, 2011). Es importante señalar que la falta de evidencia concreta relacionada con las vías de salida que se proyectan desde el LS hacia el Acb, no nos permite tener claro si el área de microinyección escogida en el LSD proyecta hacia el Acb, ya que la zona de microinyección en LS caudo-dorsal fue escogida en base al estudio que demuestra que esa zona del LS proyecta hacia las interneuronas del VTA (Luo *et al.*, 2011).

Para estudiar si la AVP en el LS podría activar las neuronas de proyección hacia el Acb, sería muy interesante posicionar la cánula guía de microinyección, por ejemplo, en una zona más rostral y observar si existe un aumento en la concentración extracelular de GABA en el Acb o en su defecto, posicionar la sonda de microdiálisis en la región rostral del Acb.

Finalmente, observamos que la AVP intra-LSD disminuye la conducta de CPP a AMPH disminuyendo la liberación de DA y la consecuente actividad neuronal en el Acb, probablemente por la vía LS-VTA-Acb. Estos resultados podrían estar dando luces de cómo la AVP en el LS podría estar modulando el circuito de la recompensa, y en consecuencia las conductas tipo adictivas. En éste sentido, la AVP podría perfilarse como un posible tratamiento experimental en conductas tipo adictivas. Sin embargo, es importante seguir investigando, debido a que se abren nuevas preguntas referentes a donde actúa la AVP: ¿Actuará por medio de las interneuronas o por medio de las neuronas GABAérgicas de proyección? o ¿estará influenciando la actividad de ambos tipos neuronales? Además, es conocido que los receptores V_{1A} no sólo se expresan en el LS por lo que la activación de otros núcleos relacionados con el circuito de la recompensa, como por ejemplo el hipocampo, podrían producir resultados distintos.

5.1 Mecanismo propuesto



Esquema 8. Mecanismo propuesto. El mecanismo que proponemos por el cual está disminuyendo el condicionamiento a AMPH, la actividad neuronal y la concentración extracelular de DA en el Acb, luego de una microinyección intra-LSD de AVP es el siguiente: la AVP se une a los receptores V_{1A} que podrían estar ubicados en los axones de las interneuronas GABAérgicas del LS, que sinaptan con las neuronas GABAérgicas de proyección en el LSD (Swanson y Cowan, 1979), generando un aumento de GABA en ésta zona (↑↑). Luego el aumento temporal de GABA inhibe a las neuronas de proyección que van hacia el VTA provocando una disminución en la liberación de GABA (↓↓). Éstas neuronas sinaptan con las interneuronas GABAérgicas del VTA, que, al disminuir su actividad, provocan una desinhibición de éstas neuronas o un aumento del tono GABAérgico de las interneuronas del VTA (amarillas gruesas), generando la consecuentemente inhibición de las neuronas dopaminérgicas de proyección.

VI.- CONCLUSIÓN

La microinyección de AVP en el LS disminuye el condicionamiento a AMPH, la actividad neuronal y los niveles de DA extracelular en Acb demostrando que la AVP en el LSD es un potente modulador del circuito de la recompensa.

VII.- PROYECCIÓN

Las proyecciones de nuestra investigación, podrían ser referentes a la localización del receptor V_{1A} , ya que se desconoce la ubicación de éste. Proponemos un experimento electrofisiológico de campo, con un protocolo de pulso pareados, en las neuronas GABAérgicas de la zona del LSD, con el cual podríamos determinar si el estímulo asociado a la AVP, se encuentra en el elemento pre sináptico o post sináptico. Otro experimento podría ser un marcaje con un marcador retrogrado combinado con la IHQ del receptor V_{1A} , con los que podría observar si el receptor se encuentra en las neuronas de proyección.

Por último, nos gustaría realizar un tratamiento sistémico en un modelo de adicciones en animales de experimentación, por medio de una administración intra nasal, que permita la incorporación de éste nonapéptido al sistema nervioso central de una forma poco invasiva y estudiar si también provoca una disminución de la conducta adictiva. Esto permitiría generar una alternativa a los actuales tratamientos experimentales contra la adicción.

VIII.- APÉNDICE

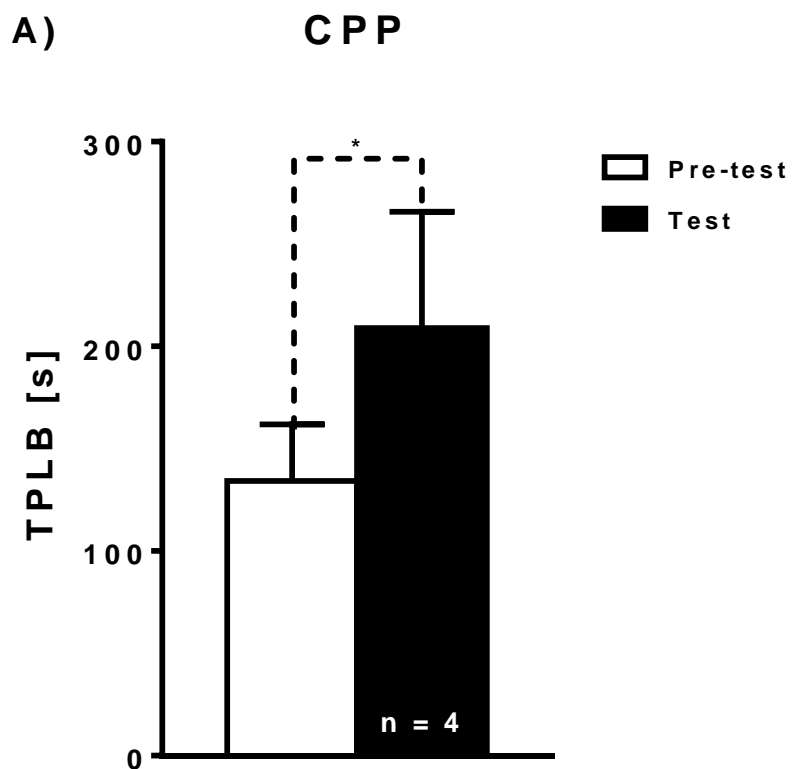


Figura suplementaria 1. Gráfico de condicionamiento a AMPH correspondiente a los animales que fueron sometidos a microdiálisis. La barra blanca grafica el tiempo de permanencia en el lado blanco (TPLB) en segundos, el día del pre-test, mientras que la barra negra grafica el TPLB el día del test. Los datos están representados como media \pm SEM. * $p < 0.05$.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada C, Bahamondes C, Cerda C.A, Silva R.A, Cruz G, Moya P.R, Sotomayor-Zárate R, Renard G.M. (2017). Amphetamine treatment affect the extra-hypothalamic vasopressinergic system in a sex-and nucleus-dependent manner. *Journal of Neuroendocrinology*. 29(4).
- Alles G.A. (1933). The comparative physiological action of dl- β -phenylisopropylamines I. Pressor effect and toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 47(3):339–354.
- Allin R, Russell V, Lamm, M, Taljaard J. (1989). Regional distribution of dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens of the rat. *Brain Research*. 501:389–391.
- Alonso J.R, Frotscher M. (1989). Organization of the Septal Region in the Rat Brain: A Golgi/EM Study of Lateral Septal Neurons. *The Journal of comparative neurology*. 22;286(4):472–487.
- Armstrong W.E and Sladek C.D. (1982). Spontaneous 'phasic-firing' in supraoptic neurons recorded from hypothalamo-neurohypophyseal explants in-vitro. *Neuroendocrinology*. 34: 405–409.
- Assaf S.Y and Miller J.J. (1977). Excitatory action of the mesolimbic dopamine system on septal neurones. *Brain Research*. 129:353–360.
- Bardo M.T and Hammer R.P. (1991). Autoradiographic localization of dopamine D1 and D2 receptor in rat nucleus accumbens: resistance to differential rearing conditions. *Neuroscience*. 45(2):281–290.
- Barker J.L, Crayton J.W, Nicoll R.A. (1971). Antidromic and orthodromic responses of paraventricular and supraoptic neurosecretory cells. *Brain Research*. 33:353–366.
- Bredewold R, Smith C.J, Dumais K.M, Veenema A.H. (2014). Sex-specific modulation of juvenile social play behavior by vasopressin and oxytocin depends on social context. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 16; 8:216.
- Brown E.E, Robertson G.S, Fibiger H.C. (1992). Evidence for conditional neuronal activation following exposure to a cocaine-paired environment: role of forebrain limbic structures. *The official journal of the Society for Neuroscience*. 12:4112–4121.
- Caboche J, Vernier P, Rogard M, Besson M-J. (1993). Haloperidol increases PPE mRNA levels in the caudal part of the nucleus accumbens in the rat. *Neuroreport*. 4:551–554.

- Caffe 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. *The Journal of comparative neurology*. 261:237–252.
- Caldwell H.K, Lee H.J, Macbeth A.H, Young W.S. (2008). Vasopressin: behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Progress in neurobiology*. 84:1–24.
- Carey M.P, Diewald L, Esposito F, Pellicano M.P, Gironi Carnevale U.A. (1998). Differential distribution affinity and plasticity of dopamine D-1 and D-2 receptors in the target sites of the mesolimbic system in an animal model of ADHD. *Behavioural Brain Research*. 94:173–185.
- Cepeda C and Levine M.S. (1998). Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Developmental neuroscience*. 20:1–18.
- Chen L and Yang C.R. (2002). Interaction of dopamine D₁ and NMDA receptors mediates acute clozapine potentiation of glutamate EPSPs in rat prefrontal cortex. *Journal of neurophysiology*. 87(5):2324–2336.
- Ciccarelli A, Calza A, Panzanelli P, Concas A, Maurizio Giustetto, Sassoe-Pognetto M. (2012). Organization of GABAergic synaptic circuits in the rat ventral tegmental area. *Plos one*. 7(10): e46250.
- Ciccocioppo R, Sanna PP, Weiss F. (2001). Cocaine-predictive stimulus induces drug-seeking behavior and neural activation in limbic brain regions after multiple months of abstinence: reversal by D₁ antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:1976–1981.
- Colussi-Mas J, Geisler S, Zimmer L, Zahm D.S, Berod A. (2007). Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a doublelabelling study. *The European journal of neuroscience*. 26:1011–1025.
- Conrad L.C, Pfaff D.W. (1976). Autoradiographic tracing of nucleus accumbens efferents in the rat. *Brain research*. 113(3):589–596.
- Curran T, Miller A.D, Zokas L, Verma I.M. (1984). Viral and cellular/os proteins: A comparative analysis. *Cell* 36:259–268.
- De Vries G.J, Buijs R.M, Sluiter A.A. (1984). Gonadal hormone actions on the morphology of the vasopressinergic innervation of the adult rat brain. *Brain Research*. 298:141–145.

- De Vry J, Donselaar I, van Ree J.M. (1988). Effects of desglycinamide⁹, (Arg⁸) vasopressin and vasopressin antiserum on the acquisition of intravenous cocaine self-administration in the rat. *Life sciences*. 42(26):2709–2715.
- Deneau G, Yanagita T, Seevers M.H. (1969). Self-administration of psychoactive substances by the monkey. *Psychopharmacologia*.16:30–48.
- Di Chiara G and 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*. 85:5274–5278.
- Di Chiara G. (2000). Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *European journal of pharmacology*. 30:393(1–3):295–314.
- Donaldson Z.R, Young L.J. (2008). Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science*. 322(5903): 900–904.
- Flannelly K.J, Kemble E.D, Blanchard D.C, Blanchard R.J. (1986). Effects of septal-forebrain lesions on maternal aggression and maternal care. *Behavioral and neural biology*. 45;(1):17–30.
- Fleischer S and Slotnick, B.M. (1978). Disruption of maternal behavior in rats with lesions of the septal area. *Physiology & behavior*. 21;(2):189–200.
- Gardner E.L. (2011). Addiction and brain reward and antireward pathways. *Advances in psychosomatic medicine*. 30:22–60.
- Godino A and Renard G.M. (2018). Effects of alcohol and psychostimulants on the vasopressin system: behavioral implications. *Journal of Neuroendocrinology*. 26: e12611.
- Greenberg M.E and Ziff E.B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*. 311:433–442.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AVJ. (1996). The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Progress in Brain Research*, 107: 485–511.
- Gysling K and Wang RY. (1983). Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain research*. 24;277(1):119–127.
- Hernando F, Schoots O, Lolait S.J, Burbach J.P. (2001). Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology*. 142(4):1659–1668.

- Hökfelt, T, Skirboll L.R, Rehfeld J.F, Goldstein M, Markey K, Dann O. (1980). A subpopulation of mesencephalic dopamine neurons projecting to limbic areas contain a cholecystokinin-like peptide: evidence from immunohistochemistry combined with retrograde tracing. *Neuroscience*. 5:2093–2124.
- Hurd Y, Weiss F, Koob G.F, Ungerstedt U. (1989). Cocaine reinforcement and extracellular DA overflow in rat nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *Brain Research*. 498:199–204.
- Ito R, Dalley J.W, Howes S.R, Robbins T.W, Everitt B.J. (2000). Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. *The Journal of Neuroscience*. 20(19):7489–7495.
- Jard S. (1983). Vasopressin isoreceptors in mammals: relation to cAMP dependent and cAMP independent transducer mechanisms. *Current Topics in Membrane Transport*. 18:225–285.
- Jonsson S, Morud J, Stomberg R, Ericson M, Söderpalm B. (2015). Involvement of lateral septum in alcohol's dopamine-elevating effect in the rat. *Addiction biology*. 22(1):93–102.
- Kankaanpää A, Meririnne E, Lillsunde P, Seppala T. (1998). The acute effects of amphetamine derivatives on extracellular serotonin and dopamine levels in rat nucleus accumbens. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 59:1003–1009.
- Koob G.F and Le Moal M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*. 278:52–58.
- Koob G.F and Volkow N.D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology Reviews*. 35:217–238.
- Koob G.F, Sanna P.P, Bloom F.E. (1998). Neuroscience of addiction. *Neuron*. 21(3):467–76.
- Koob G.F. (2008). A role for brain stress systems in addiction. *Neuron*. 10:59(1):11–34.
- Le Moal M and Simon H. (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiological reviews*. 71(1):155–234.
- Liebsch G, Wotjak C.T, Landgraf R, Engelmann M. (1996). Septal vasopressin modulates anxiety-related behaviour in rats. *Neuroscience Letters*. 217:101–104.
- Louilot A, Le Moal M, Simon H. (1989). Opposite influences of dopaminergic pathways to the prefrontal cortex or the septum on the dopaminergic transmission in the nucleus accumbens an in vivo voltammetric study. *Neuroscience*. 29:45–56.

- Lukas M, Neumann ID. (2012). Nasal application of neuropeptide S reduces anxiety and prolongs memory in rats: Social versus non-social effects. *Neuropharmacology*. 62:398–405.
- Luo A.H, Tahsili-Fahadan P, Wise R.A, Lupica C.R, Aston-Jones G. (2011). Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science*. 333(6040):353–357.
- Maeda H and Mogenson G. J. (1981). Electrophysiological responses of neurons of the ventral tegmental area to electrical stimulation of amygdala and lateral septum. *Neuroscience*. 6:367–376.
- Mathews I.Z y McCormick C.M. (2007). Female and male rats in late adolescence differ from adults in amphetamine-induced locomotor activity, but not in conditioned place preference for amphetamine. *Behavioural pharmacology*.18(7): 641–650.
- McBride W.J, Murphy J.M, Ikemoto S. (1999). Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self- administration and intracranial placeconditioning studies. *Behavioural brain research*. 101:129–152.
- Meidahl A.C, Orlowski D, Sørensen J.C.H, Bjarkam C.R. (2016). The retrograde connections and anatomical segregation of the göttingen minipig nucleus accumbens. *Frontiers in neuroanatomy*. 10:117.
- Meredith G, Wouterlood F.G, Pattiselanno A. (1990). Hippocampal fibers make synaptic contacts with glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons in the rat nucleus accumbens, *Brain Research*. 513:329–334.
- Michell R.H, Kirk C.J, Billah, M.M. (1979). Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown with particular reference to the hepatic effects of vasopressin. *Biochemical Society transactions*. 7:861–865.
- Miller C.A. and Marshall, J.F. (2005). Altered Fos expression in neural pathways underlying cue-elicited drug seeking in the rat. *The European journal of neuroscience*. 21:1385–1393.
- Morgan J.L and Curran T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogens Fos and jun. *Annual Review Neuroscience*. 14:421–451.
- Müller R, Bravo R, Burckhardt J, Curran T. (1984). Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*. 312:716–720.

- Nauta W.J, Smith G.P, Faull R.L, Domesick V.B. (1978). Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience*. 3(4–5):385–401.
- Neisewander J.L, Baker D.A, Fuchs R.A, Tran-Nguyen L.T, Palmer A, Marshall J.F. (2000). Fos protein expression and cocaine-seeking behavior in rats after exposure to a cocaine self-administration environment. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 20:798–805.
- Nestler E.J. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature review. Neuroscience*. 2:119–128.
- Nestler E.J. (2005). Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature Neuroscience*. 8(11):1445–1449.
- Nestler E.J. (2012). Transcriptional Mechanisms of Drug Addiction. *Clinical psychopharmacology and neuroscience: the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*. 10(3):136–143.
- Olazábal D.E. Young L.J. (2005). Variability in “spontaneous” maternal behavior is associated with anxiety-like behavior and affiliation in naïve juvenile and adult female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Developmental psychobiology*. 47, 166–178.
- Olds J, Milner P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of comparative and physiological psychology*. 47:419–427.
- Onteniente B. Simon H, Taghzouti K, Geffard M, Le Moal M, Calas A. (1987). Dopamine GABA interactions in the nucleus accumbens and lateral septum of the rat. *Brain research*. 421:391–396.
- Ostrowski N.L, Lolait S.J, Bradley D.J, O’Carroll A.M, Brownstein M.J, Young W.S 3rd. (1992). Distribution of V_{1A} and V₂ vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. *Endocrinology*. 131:533–535.
- Parkinson J.A, Willoughby P.J, Robbins T.W, Everitt B.J. (2000). Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs pavlovian approach behavior: further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems. *Behavioral neuroscience*. 114:42–63.

- Partilla J.S, Dempsey A.G, Nagpal A.S, Blough B.E, Baumann M.H, Rothman R.B. (2006). Interaction of amphetamines and related compounds at the vesicular monoamine transporter. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 319:237–246.
- Paxinos G and Watson C. (2009). The rat brain in stereotaxic coordinates. Compact sixth edition. Academic Press.
- Phillipson O.T and Griffiths A.C. (1985). The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*. 16(2):275–296.
- Pickens R and Harris W.C. (1968). Self-administration of d-amphetamine by rats. *Psychopharmacologia*. 12:158–63.
- Pittman Q.J, Blume H.W, Renaud L.P. (1981). Connection of the hypothalamic paraventricular nucleus with the neurohypophysis median eminence amygdala, lateral septum and midbrain periaqueductal gray: An electrophysiological study in the rat. *Brain Research*. 215:15–28.
- Pontieri F.E, Tanda G, Di Chiara G. (1995). Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:12304–12308.
- Powell E.W and Leman R.B. (1976). Connections of the nucleus accumbens. *Brain research*. 105(3):389–403.
- Prinzmetal M and Bloomberg W. (1935). The use of benzedrine for the treatment of narcolepsy. *Jama*. 105(25):2051–2052.
- Rademacher D.J, Kovacs B, Shen F, Napier T.C, Meredith G.E. (2006). The neural substrates of amphetamine conditioned place preference: implications for the formation of conditioned stimulus-reward associations. *The European journal of neuroscience*. 24(7):2089–97.
- Raggenbass M. (2008). Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *European journal of pharmacology*. 583(2–3):243–254
- Ranaldi R and Beninger R.J. (1994). Rostral–caudal differences in effects of nucleus accumbens amphetamine on VTA ICSS. *Brain Research*; 642:251–648.
- Renthal W, Carle T.L, Maze I, Covington H.E 3rd, Truong H.T, Alibhai I, Kumar A, Montgomery R.L, Olson E.N, Nestler E.J. (2008). Delta FosB mediates epigenetic

- desensitization of the c-fos gene after chronic amphetamine exposure. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:7344–7349.
- Risold P.Y, Swanson L.W. (1996). Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science*. 272(5267):1484–1486.
- Risold P.Y, Swanson L.W. (1997). Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Research Review*. 24:115–195.
- Roberts D.C.S, Koob G.F, Klonoff H.C, Fibiger H.C. (1980). Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 12:781–787.
- Robison A.J and Nestler E.J. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. (2011). *Nature reviews. Neuroscience*.12:623–637.
- Robledo P, Maldonado-Lopez R, Koob G.F. (1992). Role of dopamine receptors in the nucleus accumbens in the rewarding properties of cocaine. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 654:509–512.
- Robledo P. (2008). Las anfetaminas. *Trastornos adictivos*. 10(3):166–174.
- Rogard M, Caboche J, Julien J.F, Besson M.J. (1993). The rat nucleus accumbens: two levels of complexity in the distribution of glutamic acid decarboxylase (67 kDa) and preproenkephalin messenger RNA. *Neuroscience Letter*. 155:81–86.
- Rothman R.B and Baumann M.H. (2003). Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *European Journal of Pharmacology*. 479:23– 40.
- Ryabinin A.E, Yoneyama N, Tanchuck M.A, Mark G.P, Finn D.A. (2008). Urocortin 1 microinjection into the mouse lateral septum regulates the acquisition and expression of alcohol consumption. *Neuroscience*. 151(3):780–790.
- 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.
- Sartor G.C and Aston Jones G. A. (2012). Septal-hypothalamic pathway drives orexin neurons, which is necessary for conditioned cocaine preference. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 32(13):4623–4631.

- Shoblock J.R, Sullivan E.B, Maisonneuve I.M, Glick S.D. (2003). Neurochemical and behavioral differences between d-methamphetamine and d-amphetamine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 165:359–369.
- Song Z, Larkin TE, Malley MO, Albers HE. (2016). Oxytocin (OT) and arginine-vasopressin (AVP) act on OT receptors and not AVP V1a receptors to enhance social recognition in adult Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Hormones and behavior*. 81:20–27.
- Sotomayor-Zárate R, Araya K.A, Pereira P, Blanco E, Quiroz G, Pozo S, Carreño P, Andrés M.E, Forray M.I, Gysling K. (2010). Activation of GABA-B receptors induced by systemic amphetamine abolishes dopamine release in the rat lateral septum. *Journal of neurochemistry*. 114(6):1678–1686.
- Staiger J. F and Nurnberger F. (1991). The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: projections to the diencephalon and brainstem. *Cell and tissue research*. 264:391–413.
- Stoop R. (2012). Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron*. 76:142–159.
- Sulzer D, Sonders M. S, Poulsen N.W, Galli A. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Progress in neurobiology*. 75: 406–433.
- Swanson L.W and Cowan W.M. (1979). The Connections of the Septal Region in the Rat. *The Journal of comparative neurology*. 186(4):621–655.
- Tobar F. (2018). Efecto de la perfusión intraseptal de vasopresina sobre la liberación de GABA en septum lateral y dopamine y GABA en área tegmental ventral de ratas macho.
- Tribollet E, Barberis C, Jard S, Dubois-Dauphin M, Dreifuss J.J. (1988). Localization and pharmacological characterization of high affinity binding sites for vasopressin and oxytocin in the rat brain by light microscopic autoradiography. *Brain Research*. 442:105–118.
- Usuda I, Tanaka K, Chiba T. (1998). Efferent projections of the nucleus accumbens in the rat with special reference to subdivision of the nucleus: biotinylated dextran amine study. *Brain Research*. 797:73–93.
- Veenema A.H, Bredewold R, De Vries G.J. (2013). Sex-specific modulation of juvenile social play by vasopressin. *Psychoneuroendocrinology* 38, 2554—2561.

- 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.
- Volkow N.D and Li T.K. (2004). Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nature Reviews Neuroscience*. 5:963–970.
- Voorn P and Docter G.J. (1992). A rostrocaudal gradient in the synthesis of enkephalin in nucleus accumbens. *Neuroreport*. 3:161–164.
- White N.M and Milner P.M. (1992). The psychobiology of reinforcers. *Annual review of psychology*. 43:443–471.
- Wise R.A. (1993). In vivo estimates of extracellular dopamine and dopamine metabolite levels during intravenous cocaine or heroin self- administration. *Seminars in the Neurosciences*. 5:337–342.
- Wise R.A. (1996). Neurobiology of addiction. *Current opinion in neurobiology*. 6:243–251.
- Yu G.Z, Kaba H, Okutani F, Takahashi S, Higuchi T. (1996). The olfactory bulb: a critical site of action for oxytocin in the induction of maternal behaviour in the rat. *Neuroscience*. 72:1083–1088.
- Zaborszky L, Alheid G.F, Beinfeld M.C, Eiden L.E, Heimer L, Palkovits M. (1985). Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*. 14:427–453.
- Zahm D.S, Parsley K.P, Schwartz Z.M, Cheng A.Y. (2013). On lateral septum-like characteristics of outputs from the accumbal hedonic "hotspot" of Peciña and Berridge with commentary on the transitional nature of basal forebrain "boundaries". *The Journal of comparative neurology*. 521(1):50–68.