



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA Y NEUROFARMACOLOGÍA**

**CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA Y PLASTICIDAD CEREBRAL**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

**“PREFERENCIA DE LUGAR CONDICIONADO A ANFETAMINA Y EL SISTEMA**

**VASOPRESINERGICO EXTRAHIPOTALAMICO:**

**ESTUDIOS EN HEMBRAS Y MACHOS”**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

**CAROLINA ANDREA BAHAMONDES MENESES**

Director de Tesis: **Dr. Ramón Sotomayor-Zárate**

Co-Director de Tesis: **Dra. Georgina M. Renard**

**2015**

# AGRADECIMIENTOS

---

Agradecer al financiamiento del proyecto FONDECYT N° 11140065 de la Dra. Georgina Renard y a Committee for Aid and Education in Neurochemistry (CAEN) International Society for Neurochemistry (ISN).

Agradecer a mis directores Ramón Sotomayor y Georgina Renard y a mis profesores evaluadores Leticia Luna y Alexis Dagnino, por ser mis guías.

Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en el III Symposium Miguel Ozorio de Almeida, Brasil.

# DEDICATORIA

---

Dedico el presente trabajo a mi familia, en especial a mi madre María Angélica y a mi hermana Marian por estar siempre a mi lado, por su constante apoyo, su paciencia infinita y sus consejos.

A mi hijo José Agustín, que me acompañó desde el día uno y se convirtió en un compañero de estudio, por su sonrisa maravillosa que me llena de alegría y por su incondicional amor.

A mis amigos Catalina, Javiera, Rocío, Miguel y Alexander con quienes este viaje que parecía casi interminable se hizo más ligero y entretenido.

Y por supuesto a mis directores Georgina y Ramón que me abrieron las puertas al hermoso mundo de la ciencia y la investigación.

Infinitas gracias.

# INDICE

---

INTRODUCCIÓN.....	7
<b>Etiología:</b> .....	8
<b>Patología:</b> .....	9
<b>Circuito de la Recompensa:</b> .....	10
<b>Sistema vasopresinérgico extrahipotalámico:</b> .....	11
<b>Diferencias Sexuales:</b> .....	14
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	17
<b>Objetivo General:</b> .....	17
<b>Objetivos Específicos:</b> .....	17
MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
<b>Drogas:</b> .....	18
<b>Animales:</b> .....	18
<b>Registro de la fase del ciclo estral:</b> .....	19
<b>Fijación de tejido cerebral para inmunohistoquímica:</b> .....	22
<b>Inmunohistoquímica para Vasopresina:</b> .....	23
<b>Cuantificación de AVP por Elisa:</b> .....	24
<b>Determinación de proteínas:</b> .....	25
<b>RT-Q-PCR:</b> .....	26
<b>Análisis estadístico:</b> .....	28
RESULTADOS.....	29
<b>Salino del ciclo estral</b> .....	29
<b>Preferencia de lugar condicionado a AMPH</b> .....	29
<b>Preferencia de lugar condicionado según ciclo estral</b> .....	32
<b>Inmunohistoquímica</b> .....	33
<b>Vasopresina en SL</b> .....	35

<b>Expresión de mRNA de vasopresina</b> .....	36
DISCUSIÓN .....	37
CONCLUSIONES .....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42

# RESUMEN

---

La investigación en la neurobiología de la adicción ha estado centrada en los efectos de las drogas de abuso a nivel del Circuito de la Recompensa y ha tomado importancia el rol del Septum Lateral (SL) en este ámbito. Este núcleo límbico participa integrando diversas áreas cerebrales y se ha demostrado que la neurotransmisión vasopresinérgica en el SL participa en la regulación de conductas tipo ansiosas. Sin embargo, la regulación de este péptido por las drogas de abuso no ha sido ampliamente estudiada. En esta tesis se estudió como la administración de anfetamina (AMPH) durante el desarrollo de un protocolo de preferencia de lugar, afecta la vasopresina (AVP) extrahipotalámica, de ratas hembras y machos adultos. Mediante el protocolo de preferencia de lugar condicionado (CPP) medimos los efectos recompensantes de AMPH. Además, utilizando un kit de ELISA se midió el contenido de AVP en SL y mediante RT-q-PCR la expresión de AVP en la MeA. Nuestros resultados mostraron que el 50% de las hembras y el 78% de los machos tratados expresan la conducta de CPP a AMPH. En el caso de las hembras este condicionamiento es independiente de la fase del ciclo estral en el que se encuentran. El tratamiento con AMPH no produjo diferencias significativas en el contenido de AVP en el SL, pero sí produce una disminución en la expresión de mRNA de AVP en la MeA de ratas condicionadas, respecto de las salino. Por lo tanto, el tratamiento con AMPH produce algunas diferencias sexuales en la adquisición de la conducta de CPP a AMPH y alteraciones en el sistema vasopresinérgico.

# ABSTRACT

---

## **“AMPHETAMINE CONDITIONED PLACE PREFERENCE AND EXTRAHYPOTHALAMIC VASOPRESSINERGIC SYSTEM: A STUDY IN FEMALE AND MALE RATS”**

Research in neurobiology of drug addiction has been focused on the effects of drugs of abuse at reward circuit and the role of Lateral Septum (LS) has regained importance in this field. This nucleus is involved in integrated different areas of the brain and has been shown that vasopressinergic neurotransmission in the LS is involved in regulation of anxious-like behavior. However the regulation of drugs of abuse over this peptide has not been widely studied. The aim of this research was to study the effect of amphetamine (AMPH) administration during a conditioned place preference (CPP) protocol over extrahypothalamic vasopressin (AVP) system of adult females and males rats. We measured the rewarding effect of AMPH by CPP protocol. Besides, we measured AVP content in LS by ELISA kit and AVP mRNA expression in MeA by RT-q-PCR. Our results showed that 50% of female rats and 78% of male rats expressed CPP to AMPH. In female case this behavior was independent of the stage of estrous cycle they were. AMPH treatment did not produce difference in AVP content on LS, but in AMPH conditioned animals the AVP mRNA expression on MeA was lower than saline animals. Therefore, AMPH treatments produce sexual differences in acquisition of CPP to AMPH and produce alteration in the vasopressinergic system.

# INTRODUCCIÓN

---

## ***Etiología:***

El descubrimiento y desarrollo de compuestos naturales con el fin de solucionar problemas de salud tiene larga data, desde culturas indígenas hasta la actualidad, es así como, en la continua búsqueda de soluciones se descubrieron sustancias estimulantes que favorecían el trabajo físico o favorecían el trance en rituales religiosos mientras interactuaban con sus pares, como el alcohol y drogas psicoestimulantes. Actualmente, estas sustancias se utilizan cada vez más con fines recreativos y muy pocas veces de forma terapéutica.

La Organización Mundial de la Salud informó en 2004 que el 8,9% de la carga total de morbilidad se debe a la adicción a sustancias psicoactivas, del cual el 0,8% se debe a drogas ilícitas, entre las que se encuentran la anfetamina (AMPH), la heroína y la cocaína (OMS 2005). En el año 2010 la Organización de Naciones Unidas informó que se estima que el 0,6% de la población adulta mundial consume algún tipo de droga con potencial adictivo. Un bajo porcentaje de estos pacientes, son capaces de sobreponerse a esta condición y logran reintegrarse a la sociedad con éxito, sin embargo la población que no lo logra, puede deberse a la carencia de tratamientos psicofarmacológicos efectivos (UNODC 2012).

En Chile, según el Servicio Nacional de Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA) el 0,9% de la población (de 12 a 25 años) consume cocaína y 7,1 % marihuana (SENDA 2013). Por otro lado, en este mismo informe se determinó que el

consumo de alcohol y cigarrillos fue de 40,8% y 21,9%, respectivamente (SENDA 2013). En la actualidad, a nivel de Salud Pública no se tienen datos de la reinserción social de pacientes adictos, sin embargo la rehabilitación juvenil en adictos a drogas de abuso se ha incorporado al Programa de Garantías Estatales de Salud (CONACE 2009). Estos datos epidemiológicos recabados en encuestas del SENDA, nos demuestran la necesidad de realizar investigación para la búsqueda de factores de vulnerabilidad al consumo de drogas de abuso.

***Patología:***

Desde el ámbito patológico, la drogadicción debe ser vista como una enfermedad crónica recidivante que se caracteriza por la necesidad de buscar y tomar la droga de forma repetida, perdiendo el control en la limitación de la ingesta (American Psychiatric Association 1994; OMS 1992). Además, se debe sumar la manifestación de estados emocionales negativos, como disforia, ansiedad e irritabilidad (Koob and Le Moal 1997), sobre todo luego de periodos de abstinencia. Se cree que la fisiopatología de la adicción se basa en neuroadaptaciones moleculares, genéticas y/o farmacológicas que podrían desarrollar y mantener estos estados de adicción a largo plazo (Koob and Volkow 2010).

Teniendo todo esto en cuenta queda demostrado que, con el fin de lograr disminuir las recaídas y mejorar el tratamiento de la adicción es necesario estudiar más a fondo el proceso neuroquímico cerebral, tanto a nivel básico como clínico.

***Circuito de la Recompensa:***

Las áreas cerebrales involucradas en la neurobiología de la adicción comenzaron a investigarse en estudios pioneros como el de Olds y Milner en 1954. Estos autores estudiaron el rol de varias áreas cerebrales que participan en respuestas asociadas a aversión y placer. Algunas de estas áreas asociadas al placer fueron el Área Tegmental Ventral (VTA), Núcleo Acumbens (NAcc), Corteza Prefrontal (CPF) y el Septum Lateral (SL) (Olds and Milner 1954). Estudios posteriores de estos mismo autores, demostraron que la autoestimulación de otras zonas cerebrales, como la amígdala no produjeron placer en los animales sino aversión (Wurtz and Olds 1963). Estos estudios permitieron acuñar el término de circuito de la recompensa.

A nivel neuroquímico la regulación del Circuito de la Recompensa o Mesocorticolímbico se genera a través de la comunicación de neuronas dopaminérgicas del VTA, que liberan dopamina (DA) en el Núcleo Acumbens y en la Corteza Prefrontal (Koob and Volkow 2010). Este circuito básico es regulado por interneuronas GABAérgicas del VTA, las cuales inhiben la activación de las neuronas dopaminérgicas de proyección de este núcleo (Gysling and Wang 1983, Johnson, Seutin et al. 1992). Ahora bien no sólo se ha descrito una regulación GABAérgica intrínseca en el VTA, sino también extrínsecas provenientes de otras áreas límbicas como el Septum Lateral (Staiger and Nurnberger 1991).

A nivel funcional, el Circuito de la Recompensa es capaz de regular el placer por recompensantes naturales, como el sexo (Pfaus, Damsma et al. 1990) y la comida (Bassareo and Di Chiara 1997) a través de la liberación de DA en el Núcleo Acumbens. Sin

embargo, también se ha demostrado que este circuito neuronal es el blanco anatómico de los efectos placenteros de las drogas de abuso (Di Chiara and Imperato 1988, Kalivas and Volkow 2005, Koob and Volkow 2010).

***Sistema vasopresinérgico extrahipotalámico:***

La vasopresina (AVP), también conocida como hormona antidiurética, es una hormona peptídica secretada desde la neurohipófisis y que se encarga del equilibrio hídrico del organismo como su función más conocida. La AVP se sintetiza en el hipotálamo y se almacena en los terminales que llegan a la neurohipófisis (Guyton and Hall 2011) y sus efectos fisiológicos son mediados por la activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteína  $G_{q/11}$  ( $V_{1A}$  y  $V_{1B}$ ) y a proteína  $G_s$  ( $V_2$ ). Sin embargo, existe un sistema vasopresinérgico extrahipotalámico en el cual nos centraremos en esta tesis. El sistema vasopresinérgico extrahipotalámico está conformado por proyecciones vasopresinérgicas desde neuronas ubicadas en la amígdala extendida (Lecho del núcleo de la estría terminal [BNST] y amígdala medial [MeA]) que van hacia el SL (Lajtha, A 2007), mediando respuestas a estrés, conductuales y el propio proceso adictivo.

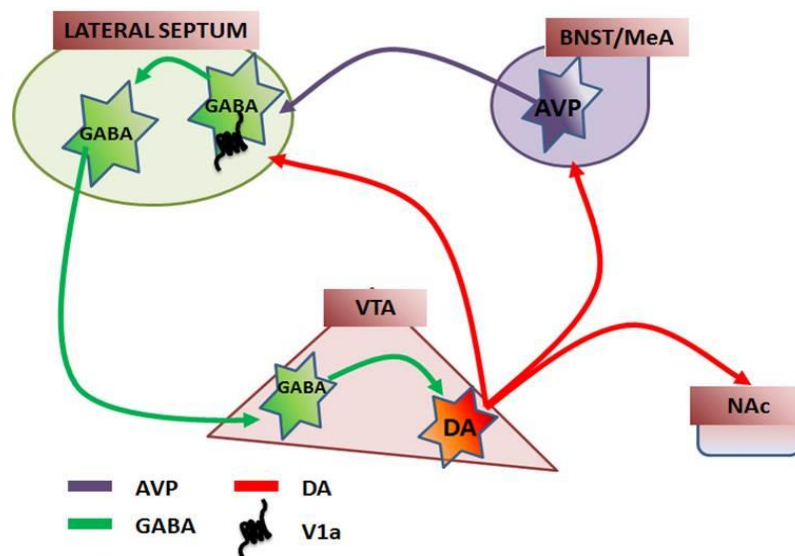
Takamura y colaboradores sugirieron que el SL podría ser considerado una estación de relevo de información contextual y motivacional, ya que neuronas de este núcleo se activan en respuesta a información asociada a la recompensa y su contexto (Takamura, Tamura et al. 2006). Además se ha observado que la administración sistémica de AMPH provoca la activación de neuronas que se proyectan desde el SL al VTA, indicando que el SL estaría involucrado en el proceso de sensibilización a AMPH (Colussi-Mas, Geisler et al.

2007). También se ha demostrado que el SL es una estructura necesaria para que se produzca la preferencia de lugar condicionada (CPP) a cocaína y que si se inhibe la actividad de este núcleo con agonistas GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> se elimina el CPP a cocaína (Sartor and Aston-Jones 2012). Por otra parte se ha demostrado que núcleos de la amígdala extendida también están involucrados en el proceso adictivo, ya que la inactivación farmacológica del BNST elimina la expresión del CPP a cocaína (Sartor and Aston-Jones 2012).

Si bien, la participación del SL, BNST y MeA en el proceso adictivo han sido estudiados, el rol de la expresión de conductas tipo adictivas sobre el sistema vasopresinérgico extrahipotálamico no ha sido explorado a fondo.

A nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), la localización de los receptores V<sub>1A</sub> es amplia. Estudios electrofisiológicos han demostrado que la AVP excita alrededor del 40 % de la neuronas del SL a través de la activación del receptor V<sub>1A</sub> (Raggenbass 2008). Las neuronas del SL están influenciadas por un tono basal inhibitorio desde el Septum Medial (MS) e interneuronas GABAérgicas del propio SL (Risold and Swanson 1997). Se ha postulado que la AVP aumenta el tono inhibitorio de interneuronas septales a través de la activación de su receptor (Raggenbass 2008) y se inhibirían las neuronas de proyección GABAérgicas desde el SL. Por otro lado, se ha observado que la AVP produce un aumento en la liberación y recaptura de DA en diferentes áreas cerebrales como la amígdala, la corteza frontal y el septum (Fig. 1) (de Wied, Diamant et al. 1993, Kovacs and Versteeg 1993). En este sentido es importante enfatizar que la DA es responsable de los efectos placenteros y

motivacionales de recompensas naturales y drogas de abuso (Di Chiara, Carboni et al. 1993, Coria-Avila, Pfau et al. 2008). Por lo tanto, la actividad de la AVP en el SL podría modular la liberación de neurotransmisores, causando cambios en los comportamientos tipo adictivos. La interacción entre los núcleos con neuronas vasopresinérgicas y los núcleos a los cuales estas proyectan, así como la relación con otros sistemas de neurotransmisores no ha sido del todo explorada, especialmente en el área de la neurobiología de la adicción. Es importante decir que el sistema vasopresinérgico presenta importantes diferencias sexuales en el cerebro. Los machos presentan mayor expresión del receptor  $V_{1A}$  y mayor densidad de fibras vasopresinérgicas que las hembras en el SL y estas diferencias no responden de forma exclusiva a hormonas sexuales (Caldwell, Lee et al. 2008).



**Fig.1:** Representación de la relación neuroanatómica y neuroquímica entre el lecho del núcleo de la estría terminal (BNST), la amígdala medial (MeA), el septum lateral (LS), el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo acumbens (NAc).

***Diferencias Sexuales:***

En las últimas décadas hemos sido testigos de un incremento importante en el uso, abuso y adicción a drogas en las mujeres. Las mujeres tienden a convertirse más rápidamente en abusadoras de drogas después del primer uso y también expresan mayor síndrome de abstinencia con altos niveles de deseo de droga y altas tasas de recaídas (Brady and Randall 1999, Bobzean, DeNobrega et al. 2014), estableciendo importantes diferencias en el comportamiento tipo adictivo y social (Young, Gobrogge et al. 2011).

Como ya sabemos el sistema vasopresinérgico es sexualmente dimórfico (De Vries, Best et al. 1983, Caffé, van Leeuwen et al. 1983) y esta diferencia podría ser la responsable de las diferencias observadas en las conductas tipo adictivas.

Dilucidar parte de estas interrogantes fue el propósito de esta tesis de pregrado, así como determinar si existen diferencias sexuales en la vulnerabilidad a la drogadicción y los efectos recompensantes de drogas de abuso como AMPH con el fin de, en un futuro, poder explorar tratamientos diferenciales para hombres y mujeres que usan y abusan de drogas.

En este sentido, esta tesis se enfocó en las alteraciones que sufren las proyecciones vasopresinérgicas desde la MeA al SL cuando se expresa la conducta de preferencia de lugar condicionado a AMPH en ratas de ambos sexos. Cabe señalar que los modelos animales más utilizados en la actualidad para el estudio de conductas tipo adictivas son: La autoadministración, la sensibilización locomotora y el CPP. En la sensibilización locomotora y en el CPP la administración de la droga es por parte del experimentador. En

esta tesis se propone utilizar CPP porque es un método fácil y económico que entrega información necesaria sobre la asociación entre placer y contexto (Katz and Gormezano 1979).

# HIPÓTESIS

---

“Ratas que expresan la conducta de preferencia de lugar condicionado a amfetamina tienen menos proyecciones vasopresinérgicas desde la amígdala medial hacia el septum lateral, respecto de ratas salino.”

# OBJETIVOS

---

## ***Objetivo General:***

Determinar los cambios en el contenido de vasopresina en las proyecciones desde la amígdala medial (MeA) al septum lateral (SL) en ratas hembras y machos que expresan la preferencia de lugar condicionada a anfetamina.

## ***Objetivos Específicos:***

**A-** Evaluar la conducta de preferencia de lugar condicionado a anfetamina (1,5 mg/Kg i.p.) en ratas hembras y machos adultas.

**B-** Evaluar la expresión de mRNA de vasopresina en MeA de ratas hembras y machos condicionadas a anfetamina (1,5 mg/Kg i.p.) y en hembras y machos salino (1 mL/Kg i.p.), a través de la técnica de RT-Q-PCR.

**C-** Evaluar el contenido de vasopresina en SL de ratas hembras y machos condicionadas a anfetamina (1,5 mg/Kg i.p.) y en ratas hembras y machos salino (1 mL/Kg i.p.), a través de la técnica de enzimo-inmuno ensayo (ELISA).

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## ***Drogas:***

La anfetamina sulfato (Laboratorio Chile S.A., Santiago, Chile) fue disuelta en solución salina fisiológica 0.9%.

## ***Animales:***

Se utilizaron ratas machos y hembras de la colonia Sprague-Dawley (de 55-60 días de edad). Las ratas fueron seleccionadas del bioterio de la Universidad de Valparaíso y se mantuvieron en un ambiente controlado con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (08:00 “on”; 20:00 “off”), con una temperatura ambiente de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  y humedad relativa de  $50 \pm 5\%$ . La luminosidad de la sala de mantención fue de 150 lux en el extremo izquierdo de la sala, 350 lux en el centro y 170 lux en el extremo derecho. El agua y la comida fueron proporcionadas *ad libitum*. Las ratas se mantuvieron en la sala de mantención de animales del Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. Los protocolos experimentales corresponden al proyecto FONDECYT N° 11140065 y fueron evaluados por los Comités de Bioética y Bioseguridad de la Dirección de Investigación de la Universidad de Valparaíso.

Las ratas machos y hembras, se dividieron al azar en dos grupos (Tabla 1) que recibieron inyecciones de AMPH (1.5 mg/Kg, i.p.; denominado grupo AMPH) o un volumen equivalente de solución salina (1 mL/Kg, i.p.; denominado grupo salino), una vez al día por 4 días. En el caso del primer grupo de hembras se realizó la técnica de

inmunohistoquímica. Los siguientes grupos de hembras y machos se sacrificaron para microdisectar el cerebro y realizar determinación de niveles de AVP en el SL mediante la técnica de ELISA y medición de mRNA de AVP en MeA por RT-Q-PCR. Las etapas del ciclo estral fueron determinadas mediante la examinación microscópica del frotis vaginal (Centola 1978) durante al menos 3 ciclos estrales consecutivos.

<b>Técnica</b>	<b>Hembras Salino</b>	<b>Hembras Tratadas</b>	<b>Macho Salino</b>	<b>Machos Tratados</b>
<b>Conducta</b>	9	12	8	9
<b>IHQ</b>	2	2	-	-
<b>mRNA</b>	4	8	4	6
<b>ELISA</b>	5	9	5	7

Tabla 1: Descripción de la cantidad de animales usados para cada una de las técnicas. Cabe destacar que de los mismos animales a los que se les aplicó el protocolo de conducta se obtuvieron las muestras para realizar las otras pruebas.

### ***Registro de la fase del ciclo estral:***

El registro diario de la etapa del ciclo estral fue realizado a partir de los 40 días de edad aproximadamente y durante el protocolo experimental el frotis vaginal se realizó luego del condicionamiento. El frotis fue colectado con una pipeta y se depositó sobre un portaobjeto (Marcondes, Bianchi et al. 2002), el cual fue observado en microscopio óptico para determinar la etapa del ciclo basado en las características citológicas que adopta el epitelio vaginal. Las etapas del ciclo estral, se dividen en (Fig. 2):


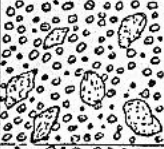
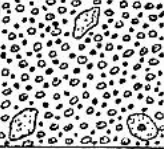

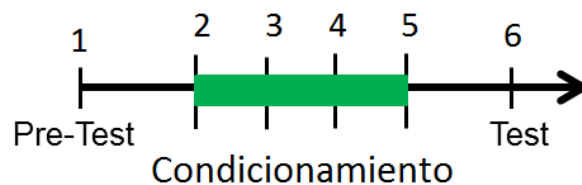
Etapas del ciclo	Genitalia externa	Frote vaginal		Comportamiento	Duración
		Descripción	Cuadro Histológico		
ESTRO	Labios hinchados (engrosados) Vagina seca	Gran cantidad de células epiteliales queratinizadas (placas o escamas corneificadas sin núcleo visible) y unas muy pocas células nucleadas.		Calor sexual (Aceptación del macho) Cópula Lordosis	12 hrs
METESTRO	Labios ligeramente hinchados Masa caseinosa en la vagina	Buena cantidad de leucocitos y pocas células epiteliales queratinizadas.		Ovulación No hay calor sexual (No hay aceptación del macho)	21 hrs
DIESTRO	Labios normales (no hinchados o engrosados) Mucosa vaginal húmeda	Gran cantidad de leucocitos, muy pocas células queratinizadas y, a veces algunas células nucleadas.		No hay calor sexual (No hay aceptación del macho)	65 hrs
PROESTRO	Labios ligeramente hinchados Vagina seca	Gran cantidad de células epiteliales nucleadas y unos muy pocos leucocitos.		Puede ocurrir calor sexual (puede haber aceptación del macho)	12 hrs

Fig. 2: Descripción de las etapas del ciclo estral, sus características citológicas, de comportamiento y duración en horas (Centola, 1978).

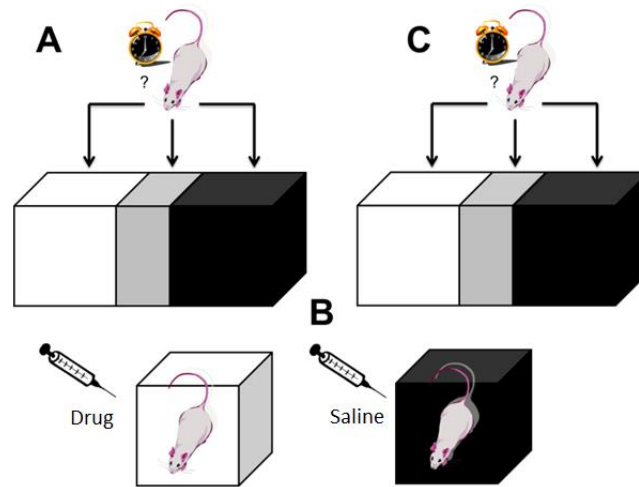
#### Preferencia de lugar condicionado a AMPH (CPP):

El protocolo de CPP usado en este proyecto de tesis fue adaptado de la literatura (Kotlinska, Gibula-Bruzda et al. 2012). El protocolo de CPP con AMPH consistió en tres fases. La primera fase de acondicionamiento, en la que se llevó a cabo un pre-test (en ausencia de droga). En esta etapa se le permitió explorar al animal todos los compartimentos del aparato de CPP por 15 minutos. Los compartimentos de aparato de CPP corresponden: a una caja blanca, un corredor neutral de color gris y una caja negra. El compartimento blanco se encuentra iluminado de forma directa por una luz blanca proveniente de una lámpara generando una luminosidad de 68 lux en este compartimento, los compartimentos gris y negro recibieron luz residual de esta lámpara

con un promedio de 2 a 3 lux. Los tres compartimientos se encuentran conectados entre sí por puertas móviles. El tiempo que los animales pasaron en cada compartimento fue grabado para determinar la preferencia basal de los animales por cualquiera de ellos. Al día siguiente comenzó la fase de condicionamiento. En esta fase los animales recibieron, por 4 días, una dosis diaria de AMPH (1,5 mg/Kg de peso i.p.), para posteriormente ser confinados por 60 min en el compartimento de menor preferencia basal (usualmente el blanco). Los animales salino recibieron una inyección de solución salina fisiológica (1 mL/Kg, i.p.), antes de ser puestos en el compartimento blanco o negro de forma alternada. Luego que este periodo de condicionamiento finalizó, se realizó un test final (en ausencia de AMPH), para medir el tiempo que pasan nuevamente los animales en los tres compartimentos del CPP (Fig. 3 y 4). La diferencia de tiempo que el animal pasa entre el test y el pretest se asocia con los efectos reforzantes de AMPH asociados al contexto en que los animales fueron condicionados a la droga. Como criterio de condicionamiento usamos el que él animal pasó  $\geq 60\%$  en el compartimento blanco el día del test, respecto del día del pretest (Mathews, Mills et al. 2008).



**Fig. 3:** Representación de las etapas del protocolo del CPP, consistente en 6 días, el primero de pre-test, luego 4 días de condicionamiento y finalmente el test.



**Fig. 4:** Representación del protocolo del CPP, comenzando con el pre-test (A), luego el condicionamiento (B) y finalizando con el test (C.)

***Fijación de tejido cerebral para inmunohistoquímica:***

Sólo al primer grupo de animales (n=4) se les realizó este protocolo con el fin de determinar las diferencias en las fibras vasopresinérgicas entre el grupo salino y el tratado con AMPH. El protocolo se llevó a cabo pasadas 24 horas desde la última inyección de AMPH (10:00 AM) y luego de realizar el test (2 horas), las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral al 8%  $p/v$  en una dosis inyectada de 400 mg/Kg i.p.). Una vez que los animales estuvieron bajo anestesia profunda se procedió a abrir su tórax y perfundir por vía transcardíaca inicialmente 100 a 200 mL de solución salina fisiológica. Posteriormente se perfundieron los animales con una solución de paraformaldehído al 4%  $p/v$  en solución tampón fosfato salino (PBS: 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.9% NaCl, pH = 7.4). Una vez terminada la perfusión, los cerebros fueron removidos y fijados durante toda noche en una solución de paraformaldehído al 4%  $p/v$ , para posteriormente ser almacenados a 4°C en una solución de sacarosa al 20%  $p/v$  durante 48 h. Las inmunoreacciones fueron llevadas a cabo en

secciones cerebrales flotantes de 30  $\mu\text{m}$  (secciones coronales) usando un criostato semiautomático (modelo KD-2950, Kedee, China) y un atlas de cerebro de rata (Paxinos and Watson 2009). Las secciones coronales de cerebro de rata que contenían anatómicamente SL fueron seleccionadas para realizar la técnica de inmunohistoquímica junto con secciones donde se encuentra el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo para usarlas como salino positivo.

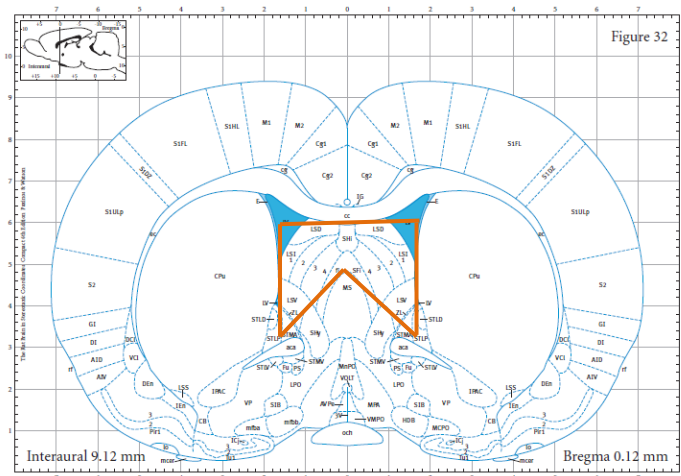
***Immunohistoquímica para Vasopresina:***

Inmediatamente antes de la inmunotinción, las secciones fueron dispuestas en una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3%  $\text{v/v}$  en PBS 0.01M durante 30 minutos para bloquear las peroxidases endógenas del tejido. A continuación, las secciones fueron incubadas en suero normal de caballo al 10%  $\text{v/v}$  por 1 hora para bloquear los sitios de unión no específicos. Las secciones cerebrales flotantes fueron cuidadosamente agrupadas en sentido antero-posterior, para asegurar la comparación de las áreas de interés. Las secciones cerebrales fueron incubadas por 24 horas a 4°C con un anticuerpo primario para AVP (anticuerpo policlonal de conejo anti-AVP: AB1565, Chemicon International) en una dilución 1:10000. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las secciones cerebrales fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado (anticuerpo anti-inmunoglobulina G anti-conejo). Posteriormente para la amplificación de la señal en las secciones cerebrales se utilizó avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain® ABC kits, Vector, USA) por 1 hora a temperatura ambiente. La inmunoreactividad citoplásmica para AVP, fue detectada con diaminobencidina (DAB), la cual genera un producto marrón.

Finalmente, las secciones cerebrales flotantes fueron montadas en portaobjetos y secadas a temperatura ambiente durante toda la noche y cubiertas con un medio de montaje Eukitt (Sigma & Aldrich, St. Louis, MO, USA) y cubreobjetos. Las secciones cerebrales montadas fueron visualizadas a través de un microscopio (Modelo BA210, Motic, Italia) acoplado a una cámara de fotos de 2 megapíxeles.

#### ***Cuantificación de AVP por Elisa:***

Luego de realizar el test final de CPP los animales fueron llevados uno a uno desde la sala de conducta al laboratorio donde se realizó la decapitación mediante guillotina para remover el cerebro. Todos los implementos usados fueron lavados con agua jabonosa, luego con alcohol y secados entre animal y animal. Luego se microdisectó el septum lateral (Bregma AP:+0,2 a -0,4 mm) con la ayuda de un atlas (Paxinos & Watson 2009) (Fig. 5). Con el fin de determinar los niveles de AVP utilizando un kit comercial de ELISA (Arginine Vasopressin EIA KIT No. 583951, Cayman Chemical) el tejido fue previamente tratado con un volumen equivalente al peso de la muestra de ácido tricloroacético (inhibidor de proteasas) y pasado por ultrasonicador. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante fue recuperado y se le agregó un volumen equivalente a 1:20 de dietiléter y fueron nuevamente centrifugadas por 5 minutos a 6.000 rpm. El sobrenadante fue eliminado y la porción restante fue almacenada a -80°C para su posterior determinación.



**Fig. 5:** Esquema de cerebro de rata sacado del atlas de Paxinos y Watson (bregma 0,12 mm) donde se observa la localización del SL (LSD: septum lateral dorsal, LSI: septum lateral intermedio, LSV: septum lateral ventral), al área seleccionada para realizar pruebas.

La técnica de enzima inmuno ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se determinó la hormona a través del uso de un método competitivo. La placa del kit para el análisis de la hormona cuenta con el anticuerpo primario específico adherido. En cada pocillo se agregó la muestra que se analizó en duplicado, la enzima y el antisuero, esto se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente, cada pocillo fue lavado con el buffer “washout”, y se agregó el sustrato Ellman’s Reagent, incubándose a temperatura ambiente por una hora. Finalmente se leyó la placa en un lector de placa a 405 nm. Los datos de la muestra se interpolaron en la curva de calibrado donde se obtuvo la concentración de la hormona en la muestra. La intensidad del color que se formó es inversamente proporcional a la concentración de AVP libre en la muestra.

#### ***Determinación de proteínas:***

El pellet obtenido luego de la primera centrifugación del tejido del SL fue almacenado a temperatura ambiente con 400 µL de NaOH 1N. La medición se llevó a cabo mediante la

utilización de un kit para determinar proteínas totales (Bio-Rad protein assay dye reagent), que se basa en la unión de un colorante a las proteínas. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible, simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Al momento de la determinación el pellet de cada muestra fue homogenizado en la solución de NaOH, un volumen de 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra fue tomado y puesto en un pocillo individual al que además se le agregó 158  $\mu\text{L}$  de agua y 40  $\mu\text{L}$  del colorante. Finalmente se leyó la placa en un lector de placa a 595 nm. Los datos de la muestra se interpolaron en la curva de calibrado donde se obtuvo la concentración de proteínas en la muestra.

***RT-Q-PCR:***

Se extrajo el RNA total de la MeA microdisectada (Bregma AP: -2,1 a -3,6 mm), utilizando RNeasy Mini Kit (Catálogo N°74104, Qiagen, Valencia, CA, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se cuantificó 1,5  $\mu\text{L}$  de RNA total extraído en un equipo Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) a través del programa NanoDrop versión 37.1, realizando el blanco con agua libre de RNAsas. Solo las muestras de RNA con la relación de la Abs 260/280 entre 1.8-2.0 se utilizaron para los análisis. Se calculo la concentración en el total de la muestra y se realizaron las diluciones necesarias para tener una concentración normalizada de 10 ng/ $\mu\text{L}$  en todas las muestras y con estas se realizaron los análisis posteriores.

La preparación del templado de cDNA y mRNA se llevará a cabo en un Sistema de Detección PCR Real-Time CFX96, marca BIO-RAD del Laboratorio de Neurogenética dirigido por el Dr. Pablo R. Moya. A 4 ng de RNA total fue sujeto a transcripción reversa usando el Kit de Transcripción Reversa QuantiTect (Catálogo N°205314, Qiagen, Valencia, CA, USA). La reacción de transcripción reversa fue realizada en un master mix el cual incluyó 8 µL del RNA total (libre de DNA genómico), 1 µL de Transcriptasa Reversa Quantiscript, 4 µL Buffer RT Quantiscript 5X, 1 µL Primer Mix RT. Se incubó por 15 minutos a 42°C, luego 3 minutos a 95°C para inactivar la Transcriptasa Reversa Quantiscript, finalizado esto se almacenó a -20°C.

Para la cuantificación del mRNA de AVP, todas las muestras fueron analizadas por duplicado en un volumen de reacción de 10 µL, por medio de un mix de reacción estándar para la reacción de PCR en tiempo real, el cual contenía: 5 µL Kit SYBR Green PCR QuantiTect (Catálogo N°204143, Qiagen Valencia, CA, USA), 2.8 µL agua libre de RNAsas, 0.1 µL de cada primer y 2 µL de cDNA. Para la amplificación del gen específico se realizó un protocolo estándar que consiste en de 59 ciclos en un Real-Time PCR Detection System CFX96 Touch™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

La secuencia de los primers para AVP que se utilizaron fue: sentido 5' TGC-CTG-CTA-CTT-CCA-GAA-CTG-C 3' y antisentido 5' AGG-GGA-GAC-ACT-GTC-TCA-GCT-C 3'. Los primers fueron diseñados a partir de la secuencia para AVP publicada en GeneBank: número de acceso NM\_016992.2. La reacción de amplificación se realizó a 59 ciclos, través de la activación de la Taq polimerasa a 95°C por 2 min, denaturación a 95°C por 30 seg,

apareamiento a 60°C por 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg. La secuencia de los primers para 18S fue: sentido 5'-TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG-3' y antisentido 5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3'. La reacción de amplificación comenzó con la activación de la Taq polimerasa a 95°C por 10 min, 45 ciclos de denaturación a 95°C por 10 seg, apareamiento a 60°C por 20 seg, extensión a 72°C por 25 seg.

***Análisis estadístico:***

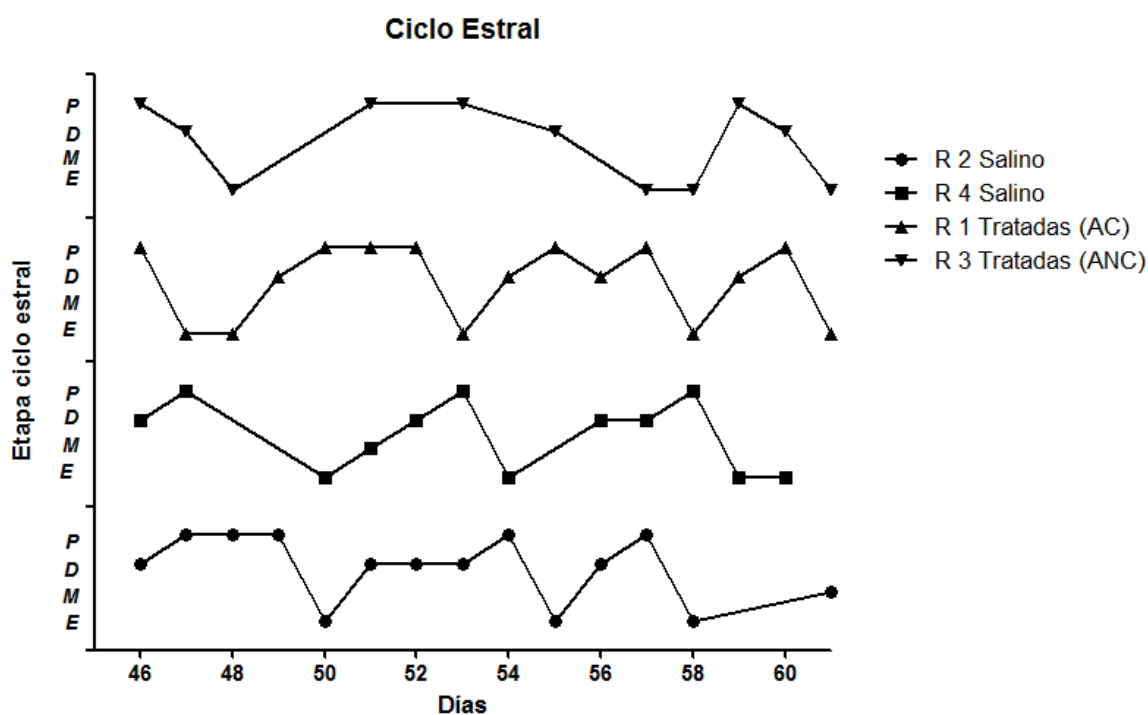
Los resultados son expresados como valor promedio  $\pm$  error estándar medio (SEM). Las figuras que muestran el tiempo de permanencia en los compartimentos del aparato de CPP fueron analizadas mediante test-*t* de student's no-pareado para comparar los valores obtenidos el día del pretest y del test, y la diferencia estadísticamente significativa se estableció cuando el valor de *p* fue menor a 0,05. Las figuras que muestran el contenido de AVP en SL fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido por un post-test bonferroni.

Las figuras que muestran la expresión de mRNA de AVP en MeA fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido por un post-test bonferroni. La diferencia estadísticamente significativa se estableció cuando el valor de *p* fue menor a 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

# RESULTADOS

## *Control del ciclo estral*

En la figura 6 se observan curvas representativas del ciclo estral de hembras salino y tratadas con AMPH. Observamos que las hembras tratadas con AMPH ciclan de manera normal durante el tratamiento, al igual que las hembras salino.



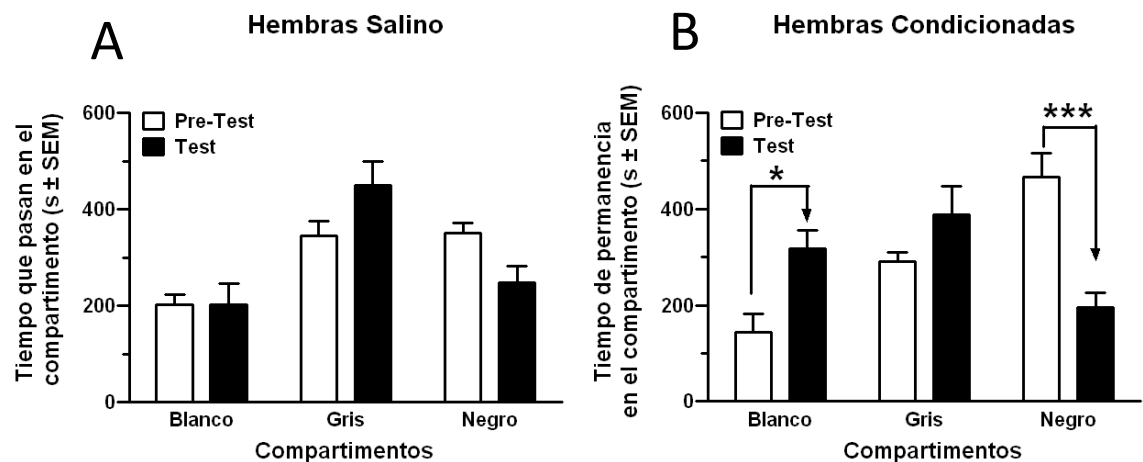
**Fig. 6:** Curva representativa de la etapa del ciclo estral de 4 hembras, 2 salino y 2 tratadas con AMPH desde el día postnatal 46 hasta finalizar el tratamiento. P, proestro; D, diestro; M, metaestro; E, estro.

## *Preferencia de lugar condicionado a AMPH*

En la figura 6 observamos el tiempo de permanencia en los distintos compartimentos del aparato de CPP en ratas hembras salino (A) y ratas hembras condicionadas (B) el día del

pretest y el día del test. Observamos que las hembras salino no presentan diferencias significativas en el tiempo de permanencia en los distintos compartimentos del aparato de CPP el día del pretest en comparación con el día del test (Fig. 7 A).

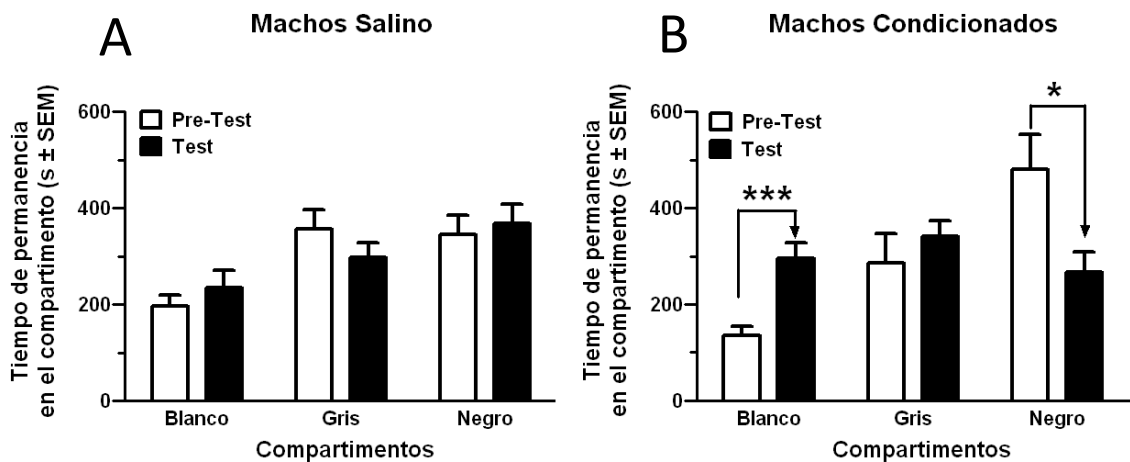
En cuanto a los animales tratados con AMPH, sólo el 50% de las hembras (6 de 12 hembras tratadas) superó el criterio para considerarlas condicionadas a AMPH. Estas hembras condicionadas pasaron significativamente ( $*p < 0,01$ ) más tiempo en el compartimento blanco apareado a AMPH el día del test, comparado con el tiempo que pasaron en el mismo compartimento el día del pretest. Así mismo podemos observar que pasaron significativamente ( $*** p < 0,001$ ) menos tiempo en el compartimento negro (no apareado a la droga) el día del test comparado con el día del pretest, reflejando la adquisición de la conducta condicionada (Fig. 7 B).



**Fig. 7:** Tiempo de permanencia en los distintos compartimentos del CPP que pasan las hembras salino (A) y condicionadas (B) durante el pretest y el test. Las hembras condicionadas pasan significativamente ( $p < 0,01$ ) más tiempo en el compartimento blanco el día del test comparado con el pretest, así como significativamente menos tiempo en el compartimento negro el día del test comparado con el pretest ( $n = 6$ ). En cambio las hembras salino no presentan diferencias significativas en el tiempo que pasan en los distintos compartimentos el día del test comparado con el día del pretest ( $n = 9$ ).

En la figura 8 observamos el tiempo de permanencia en los distintos compartimentos del aparato de CPP en ratas machos salino (Fig. 8A) y ratas machos condicionadas (Fig. 8B) el día del pretest y el día del test. Observamos que los machos salino no presentan diferencias significativas en el tiempo de permanencia en los distintos compartimentos del aparato de CPP el día del pretest en comparación con el día del test (Fig. 8A).

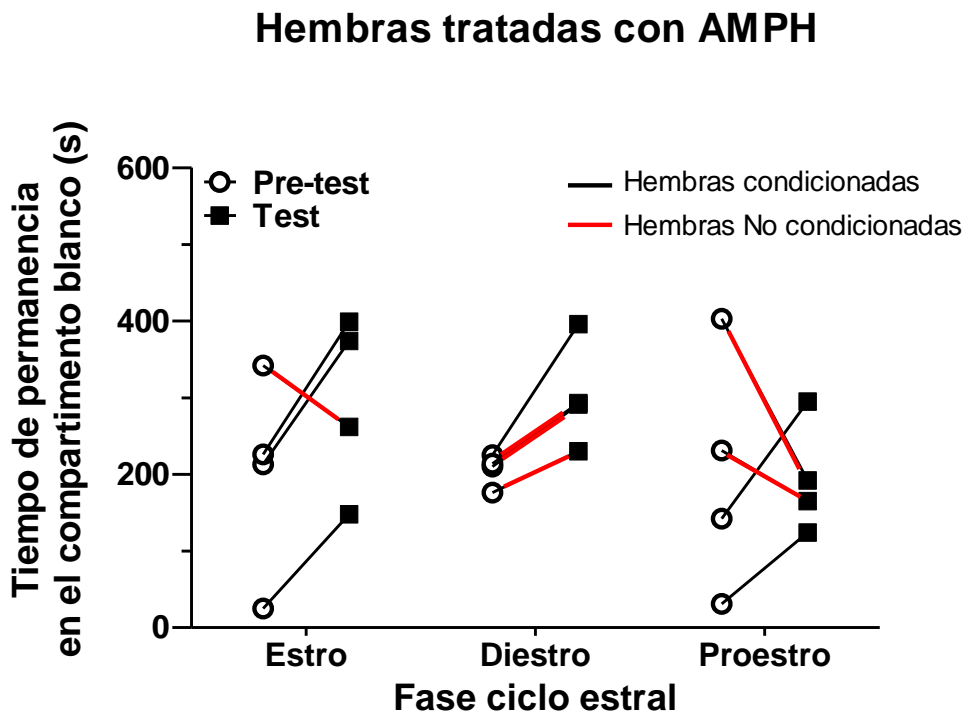
El 78% de los machos tratados con AMPH superó el criterio de pasar  $\geq 60\%$  de tiempo en el compartimento blanco el día del test comparado el día del pretest. Estos pasaron significativamente (\*\*\*) más tiempo en el compartimento blanco el día del test comparado con el día del pretest, así mismo pasaron significativamente (\* $p < 0,02$ ) menos tiempo en el compartimento negro el día del test comparado con el día del pretest, reflejando la adquisición de la conducta condicionada (Fig. 8B)



**Fig. 8:** Tiempo de permanencia en los distintos compartimentos del CPP que pasan las hembras salino (A) y condicionadas (B) durante el pretest y el test. Los machos condicionados pasan significativamente ( $p < 0,001$ ) más tiempo en el compartimento blanco el día del test comparado con el pretest, así como significativamente menos tiempo en el compartimento negro el día del test comparado con el pretest ( $n = 7$ ). Mientras que los machos salino no presentan diferencias significativas en el tiempo que pasan en los distintos compartimentos el día del test comparado con el día del pretest ( $n = 8$ ).

### *Preferencia de lugar condicionado según ciclo estral*

En la figura 9 está representada la etapa del ciclo estral de hembras condicionadas y no condicionadas el día del pretest y el día del test. Observamos que las hembras tratadas con AMPH, tanto condicionadas como no condicionadas, se encuentran en distintas fases del ciclo estral el día del pretest y el día del test, por lo que podemos decir que la adquisición de la conducta de condicionamiento por AMPH es independiente de la fase del ciclo estral en la que se encuentre el animal.

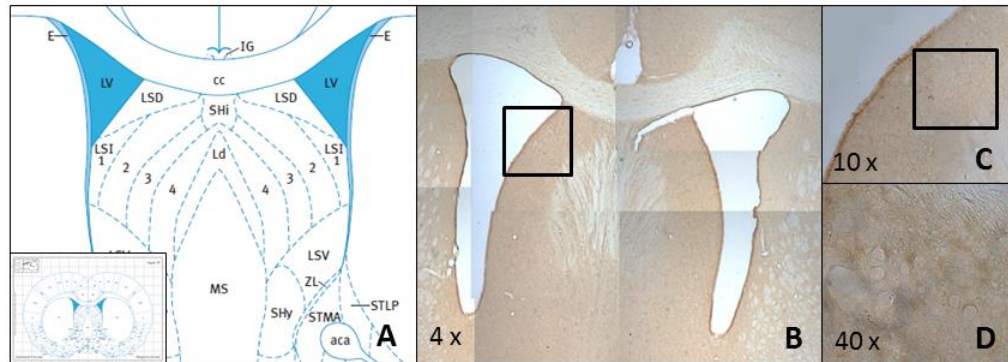


**Fig. 9:** Tiempo de permanencia en el compartimento blanco de las ratas hembras tratadas con AMPH el día del test comparado con el día del pretest como medida de condicionamiento y teniendo en cuenta las fase del ciclo en que se encuentran el día del test (n= 12).

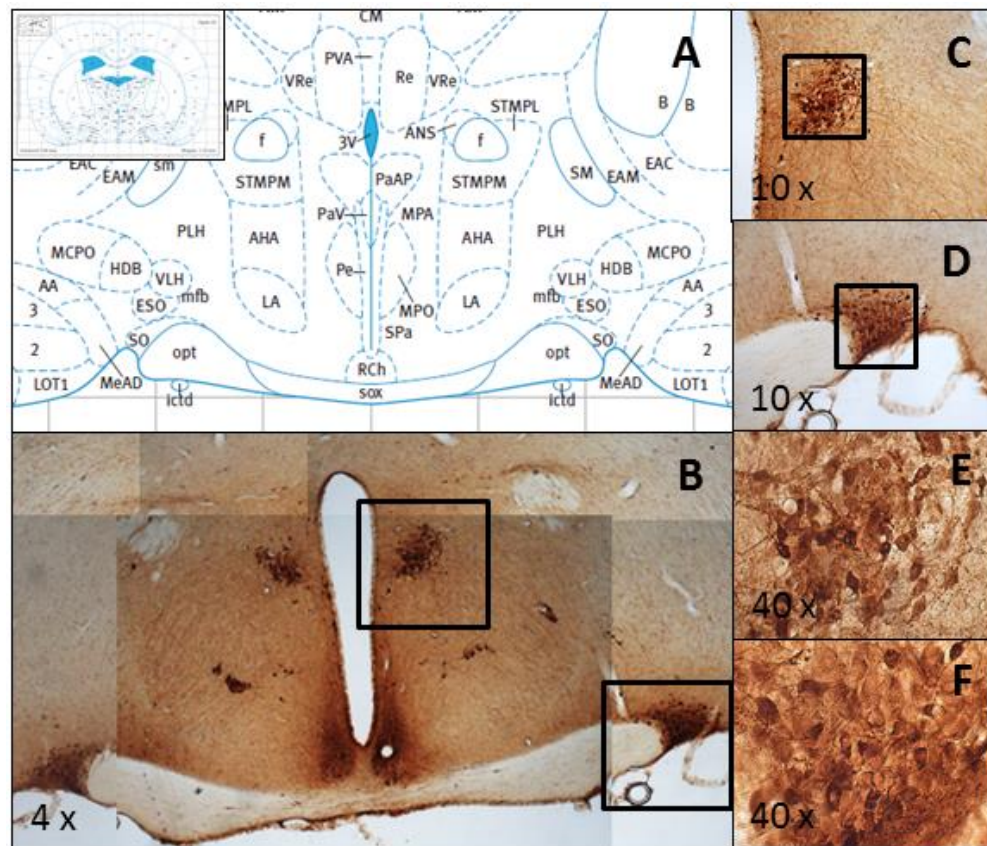
### ***Inmunohistoquímica***

La técnica de inmunohistoquímica no reveló expresión de fibras vasopresinérgicas en el área de interés del SL, pero sí lo hizo en otras áreas, como el PVN y núcleo supraóptico las cuales no fueron cuantificadas, ya que no resultó en nuestra área de interés. La colchicina usada como pretratamiento en animales a los que se les realizará inmunohistoquímica, bloquea el transporte axonal (Dahlstrom 1968) de vasopresina, acumulándola en el BNST y MeA, permitiendo la cuantificación del péptidos que se encuentra en baja concentración (Caffe and van Leeuwen 1983, van Leeuwen and Caffe 1983). Puede deberse a la falta en el pretratamiento de los animales que en nuestra investigación no fue posible detectar las proyecciones de AVP al SL. Otro de los factores que influye en la detección por inmunohistoquímica de péptidos en bajas concentraciones son los anticuerpos primarios utilizados, se necesita un anticuerpo específico creado en el mismo laboratorio donde se alcanzó a ver la expresión de AVP, capaz de marcar los péptidos, en este caso AVP, que se encuentran a muy bajas concentraciones.

En la figura 10 y 11 podemos observar cortes de secciones cerebrales, donde se destacan núcleos como el SL (10) y el PVN y núcleo supra óptico (11). En esta podemos demostrar que en nuestro núcleo de interés, septum lateral, no se observa la inmunomarca de AVP, pero si la podemos observar en otros núcleos donde su concentración es mayor.



**Fig. 10:** (A) Esquema de cerebro de rata sacado del atlas de Paxinos y Watson (bregma 0,36 mm) donde se observa la localización del SL (LSD: septum lateral dorsal, LSI: septum lateral intermedio, LSV: septum lateral ventral); (B) inmunohistoquímica a corte de cerebro a rata hembra tratada con AMPH; (C) área de septum lateral a 10x; (D) área de septum lateral a 40x.

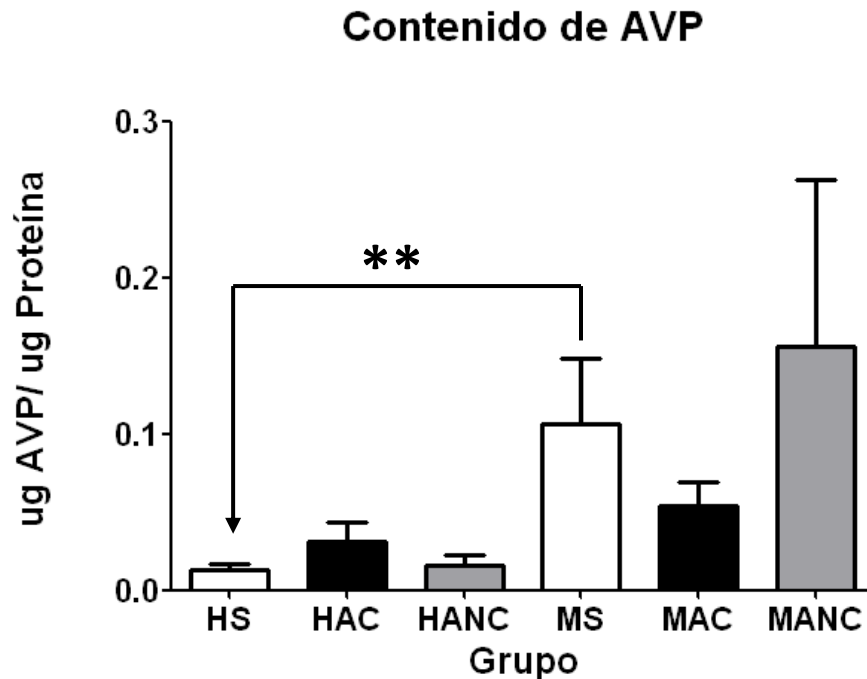


**Fig. 11:** (A) Esquema de corte de cerebro de rata según atlas de cerebro de rata Paxinos y Watson (bregma - 1,32 mm) donde se puede observar la ubicación del núcleo paraventricular (PaAP), núcleo supra óptico (SO); (B) inmunohistoquímica a corte de cerebro a rata hembra tratada con AMPH; (C) área de PaAP a 10x; (D) área de SO a 10x; (E) área de PaAP a 40x; (F) área de SO a 40x.

### ***Vasopresina en SL***

Cuantificamos por ELISA los niveles de AVP en SL de ratas hembras y machos salino y tratadas con AMPH.

En la figura 12 observamos que existe una diferencia significativa (\*\*  $p < 0,005$ ) en el contenido de vasopresina entre machos y hembras salino. Las ratas machos salino tienen mayor contenido de vasopresina en el SL que las ratas hembras salino. En los machos condicionados se observa una disminución del contenido de AVP, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa.

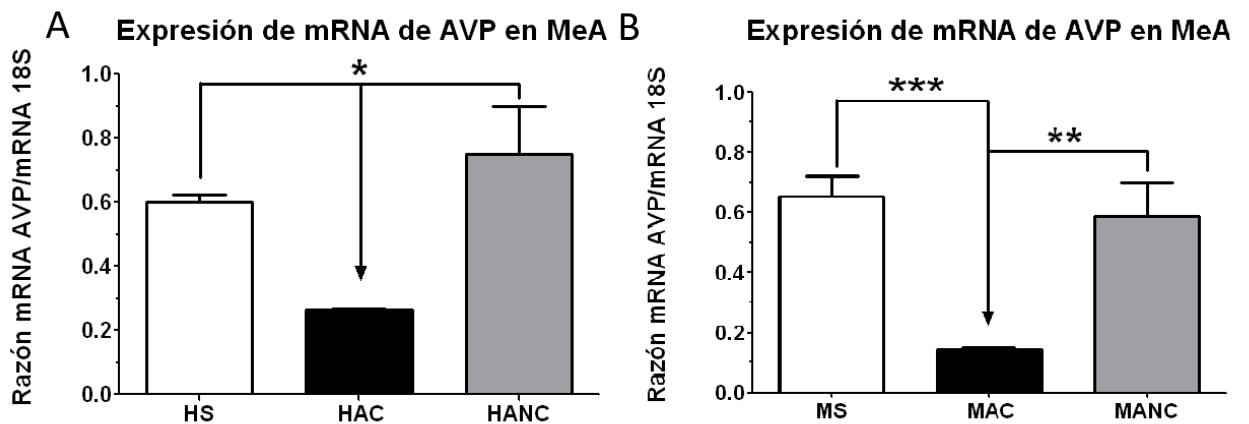


**Fig. 12:** Contenido de AVP expresado en pg por ug de proteína total en el septum lateral de hembras salino (n=4), hembras condicionadas (n=4), hembras tratadas con AMPH no condicionadas (n=3), machos salino (n=4), machos condicionados a AMPH (n=4) y machos tratados con AMPH no condicionadas (n=2).

### Expresión de mRNA de vasopresina

Cuantificamos por RT-Q-PCR los niveles de mRNA de AVP en la MeA de ratas hembras (Fig. 13A) y machos (Fig.13B) salino y tratadas con AMPH.

Observamos que la expresión del mRNA de AVP en MeA en hembras (A) y machos (B) tratados con AMPH condicionados disminuye significativamente (Fig 13 A \* $p < 0,05$ , Fig. 13 B \*\*\* $p < 0,0001$ ) respecto de sus pares salino. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la expresión del mRNA entre hembras y machos salino con las respectivas ratas hembras tratadas con AMPH no condicionadas y machos tratados con AMPH no condicionados.



**Fig. 13:** Expresión del mRNA de AVP normalizado con mRNA 18s en hembras (A) y machos (B) salino y tratados con AMPH. Hembras salino (n=4), hembras condicionadas (n=3), hembras tratadas con AMPH no condicionadas (n=3), machos salino (n=3), machos condicionados a AMPH (n=3) y machos tratados con AMPH no condicionadas (n=2).

# DISCUSIÓN

---

En esta tesis estudiamos los efectos del condicionamiento a anfetamina sobre el sistema vasopresinérgico extrahipotalámico en ratas hembras y machos. Nuestros resultados mostraron que un menor porcentaje de las hembras tratadas con anfetamina se condicionaron comparándolo con los machos, resultado que es contrario a lo observado en la bibliografía (Beatty and Holzer 1978, Robinson, Becker et al. 1980, Brass and Glick 1981).

Es sabido que las hembras tienen mayor tendencia a expresar las conductas tipo adictivas y se hacen dependiente más rápidamente que los machos (Beatty and Holzer 1978) cuando se exponen a drogas de abuso e incluso luego de la primera dosis (Bobzean, DeNobrega et al. 2014), pero en nuestro caso la expresión de la conducta condicionada fue al revés. Esto puede deberse al estrés inducido por la examinación vaginal diaria, a fin de determinar la etapa del ciclo en que se encuentran. Según Sfikakis la manipulación para la realización del examen vaginal, junto con el examen vaginal mismo aumenta los niveles de cortisol, induciendo un estado de estrés en los animales (Sfikakis, Galanopoulou et al. 1996), es por esto que se recomienda evitar el examen de citología vaginal en protocolos posteriores. Además es sabido que el estrés no predecible inhibe la capacidad para desarrollar la conducta condicionada por AMPH (Papp, Willner et al. 1991) y otras drogas (Papp, Lappas et al. 1992), así como también las condiciones de crianza de los animales. Esto sugiere que existe una posibilidad en que la droga sea percibida como un estímulo diferente (por

ejemplo distinto del salino) el que puede contribuir significativamente en la capacidad de la droga para producir CPP (Para revisión ver Tzschentke 2007), lo que podría explicar que sólo el 50% de las hembras se condicionó.

Si bien en otros trabajos donde hacen CPP con hembras, no ciclan a los animales, uno de nuestros objetivos era averiguar si había alguna diferencia en el condicionamiento según la etapa del ciclo en la que se encuentran los animales al realizar el test, que pudiera estar influenciando el condicionamiento. En este sentido, nuestros resultados demostraron que la adquisición de la conducta condicionada en hembras es independiente de la etapa del ciclo estral. Se ha demostrado en otros estudios que la liberación de dopamina por AMPH es menor durante las etapas del ciclo diestro y proestro respecto del estro (Becker and Ramirez 1981, Becker, Robinson et al. 1982), pero que se expresa mayor adquisición de la conducta en la fase del ciclo diestro que en estro o proestro (Mathews and McCormick 2007). Esto podría llevar a suponer que las hormonas circulantes en las distintas etapas del ciclo juegan un rol sobre este sistema y por ende en el efecto recompensante de la AMPH. Se sabe que las mujeres que se encuentran en fase folicular del ciclo menstrual, cuando los niveles hormonales de estradiol están en su nivel peak experimentan mayores efectos positivos por el consumo de drogas (Turner and de Wit 2006). Con los resultados de esta tesis podemos demostrar que nuestro protocolo de condicionamiento, donde las hembras están ciclando de manera normal, la AMPH igualmente produce efectos recompensantes asociados al contexto de administración.

En cuanto al sistema vasopresinérgico extrahipotalámico, en nuestros resultados observamos que las ratas hembras salino poseen significativamente menor contenido de AVP en el SL que las ratas machos salino, lo cual es consistente con las diferencias sexuales observadas en la literatura (Caldwell, Lee et al. 2008). La disminución en los niveles de AVP en los machos condicionados a AMPH, aunque no fue significativa, es consistente con la disminución del mensajero de AVP en la MeA. Esto nos podría estar indicando que la AVP de este sistema extrahipotalámico podría estar jugando un papel en las conductas de condicionamiento a AMPH en las ratas machos. Además, como se observa en los machos no condicionados los niveles de AVP y del mRNA son similares a los animales salino. Es conocido que la AVP modula diferentes conductas en machos y en hembras [para revisión ver (Caldwell, Lee et al. 2008, Frank and Landgraf 2008, Paul, Terranova et al. 2014)]. Además es conocido que no el 100% de los animales tratados con drogas de abuso adquieren las conductas tipo adictivas (Beatty and Holzer 1978, Deminiere, Piazza et al. 1989), al igual que no todos los consumidores de drogas se vuelven adictos (O'brian 1986). En este sentido, la AVP extrahipotalámica podría ser uno de los neuromoduladores involucrados en estas diferencias. Es importante considerar que el contenido de AVP en SL depende no solamente de las proyecciones desde MeA, sino también desde BNST, por lo que en el futuro deberá estudiarse las alteraciones en este núcleo en nuestro protocolo experimental.

Nuestros resultados demostraron que la expresión de mRNA de AVP en MeA disminuye en animales que adquieren la conducta condicionada a AMPH, al contrario de lo que sucede

con el condicionamiento a cocaína (Rodríguez-Borrero, Rivera-Escalera et al. 2010) y en ratas alcohólicas (Zhou, Colombo et al. 2011), por el contrario disminuye en animales que experimentan abstinencia aguda (Zhou, Bendor et al. 2005). Los animales que no expresaron la conducta condicionada no presentaron diferencias significativas respecto de los animales salino. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre sexos. Es sabido que la expresión de genes de AVP en MeA está regulada por testosterona (Szot and Dorsa 1994), lo que podría llevar a inferir mayor expresión del gen en machos que en hembras. Los estrógenos y la progesterona también modulan la expresión del mensajero de AVP. Se sabe que la progesterona está colocalizada en casi todas las neuronas vasopresinérgicas de BNST y MeA (Auger and De Vries 2002), la que podría estar involucrada en su regulación y que la administración de esta produce la disminución de neuronas reactivas en ambos núcleos (Auger and Vanzo 2006). En el caso de los estrógenos y la testosterona es sabido que la gonadectomía reduce la expresión del mRNA en BNST y MeA, la que se restaura con terapia de reemplazo hormonal de estrógenos en hembras y testosterona en machos (De Vries and al-Shamma 1990). Se ha reportado que el efecto de los estrógenos está mediado por los receptores alfa y beta, que se encuentran colocalizados con células vasopresinérgicas y los que tendrían influencia sobre elementos de respuesta a estrógenos de la región promotora del gen de vasopresina (Shapiro, Xu et al. 2000). Por lo que se recomienda medir hormonas circulantes para poder identificar alguna influencia de estas sobre la expresión del gen.

# CONCLUSIONES

---

1) La preferencia de lugar condicionado a AMPH produce la expresión de la conducta condicionada en el 50% de las ratas hembra y en el 78% de las ratas macho adultas. Esta expresión de la conducta en hembras es independiente de la fase del ciclo en que se encuentren las hembras.

2) El contenido de AVP en SL de ratas macho salino es mayor que el de ratas hembras salino.

3) La preferencia de lugar condicionado a AMPH no produce diferencias significativas en el contenido de AVP en SL de ratas machos y hembras tratadas respecto de las ratas salino. Sin embargo, se observa una disminución de los niveles de AVP en machos condicionados con respecto a los salinos.

4) La preferencia de lugar condicionado a AMPH disminuye la expresión del gen de AVP en MeA de ratas hembras y machos condicionadas respecto de los grupos salino. Tanto hembras como machos no condicionados no presentan diferencias significativas en la expresión del gen respecto de los grupos salino.

# BIBLIOGRAFÍA

---

- American Psychiatric Association (1994). "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders." 4th ed. Washington DC, American Psychiatric Press.
- Auger, C. J. and G. J. De Vries (2002). "Progesterin receptor immunoreactivity within steroid-responsive vasopressin-immunoreactive cells in the male and female rat brain." *J Neuroendocrinol* 14(7): 561-567.
- Auger, C. J. and R. J. Vanzo (2006). "Progesterone treatment of adult male rats suppresses arginine vasopressin expression in the bed nucleus of the stria terminalis and the centromedial amygdala." *J Neuroendocrinol* 18(3): 187-194.
- Bassareo, V. and G. Di Chiara (1997). "Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum." *J Neurosci* 17(2): 851-861.
- Beatty, W. W. and G. A. Holzer (1978). "Sex differences in stereotyped behavior in the rat." *Pharmacol Biochem Behav* 9(6): 777-783.
- Becker, J. B. and V. D. Ramirez (1981). "Sex differences in the amphetamine stimulated release of catecholamines from rat striatal tissue in vitro." *Brain Res* 204(2): 361-372.
- Becker, J. B., et al. (1982). "Sex differences and estrous cycle variations in amphetamine-elicited rotational behavior." *Eur J Pharmacol* 80(1): 65-72.
- Bobzean, S. A., et al. (2014). "Sex differences in the neurobiology of drug addiction." *Exp Neurol* 259: 64-74.
- Brady, K. T. and C. L. Randall (1999). "Gender differences in substance use disorders." *Psychiatr Clin North Am* 22(2): 241-252.
- Brass, C. A. and S. D. Glick (1981). "Sex differences in drug-induced rotation in two strains of rats." *Brain Res* 223(1): 229-234.
- Caffe, A. R. and F. W. van Leeuwen (1983). "Vasopressin-immunoreactive cells in the dorsomedial hypothalamic region, medial amygdaloid nucleus and locus coeruleus of the rat." *Cell Tissue Res* 233(1): 23-33.
- Caffe, A. R., et al. (1987). "Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus." *J Comp Neurol* 261(2): 237-252.
- Caldwell, H. K., et al. (2008). "Vasopressin: behavioral roles of an "original" neuropeptide." *Prog Neurobiol* 84(1): 1-24.

- Centola, G. M. (1978). "Surface features of exfoliated vaginal epithelial cells during the oestrous cycle of the rat examined by scanning electron microscopy." *J Anat* 127(Pt 3): 553-561.
- Colussi-Mas, J., et al. (2007). "Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double-labelling study." *Eur J Neurosci* 26(4): 1011-1025.
- CONACE (2009). "Estrategia Nacional sobre Drogas 2009-2018." Santiago, Chile, Gobierno de Chile.
- Coria-Avila, G. A., et al. (2008). "[Conditioned preferences induced by sex and drugs: a comparison of the neural bases]." *Rev Neurol* 46(4): 213-218.
- Dahlstrom, A. (1968). "Effect of colchicine on transport of amine storage granules in sympathetic nerves of rat." *Eur J Pharmacol* 5(1): 111-113.
- De Vries, G. J. and H. A. al-Shamma (1990). "Sex differences in hormonal responses of vasopressin pathways in the rat brain." *J Neurobiol* 21(5): 686-693.
- De Vries, G. J., et al. (1983). "The influence of androgens on the development of a sex difference in the vasopressinergic innervation of the rat lateral septum." *Brain Res* 284(2-3): 377-380.
- de Wied, D., et al. (1993). "Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides." *Front Neuroendocrinol* 14(4): 251-302.
- Deminieri, J. M., et al. (1989). "Experimental approach to individual vulnerability to psychostimulant addiction." *Neurosci Biobehav Rev* 13(2-3): 141-147.
- Di Chiara, G., et al. (1993). "Stimulation of dopamine transmission in the dorsal caudate nucleus by pargyline as demonstrated by dopamine and acetylcholine microdialysis and Fos immunohistochemistry." *Neuroscience* 55(2): 451-456.
- Di Chiara, G. and A. Imperato (1988). "Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(14): 5274-5278.
- Frank, E. and R. Landgraf (2008). "The vasopressin system--from antidiuresis to psychopathology." *Eur J Pharmacol* 583(2-3): 226-242.
- Guyton, A. C. and J. E. Hall (2011). "Tratado de fisiología médica." Barcelona, España, Elsevier España, S.L.
- Gysling, K. and R. Y. Wang (1983). "Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat." *Brain Res* 277(1): 119-127.
- Johnson, S. W., et al. (1992). "Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump." *Science* 258(5082): 665-667.
- Kalivas, P. W. and N. D. Volkow (2005). "The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice." *Am J Psychiatry* 162(8): 1403-1413.

- Katz, R. J. and G. Gormezano (1979). "A rapid and inexpensive technique for assessing the reinforcing effects of opiate drugs." *Pharmacol Biochem Behav* 11(2): 231-233.
- Koob, G. F. and M. Le Moal (1997). "Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation." *Science* 278(5335): 52-58.
- Koob, G. F. and N. D. Volkow (2010). "Neurocircuitry of addiction." *Neuropsychopharmacology* 35(1): 217-238.
- Kotlinska, J. H., et al. (2012). "Modulation of neuropeptide FF (NPFF) receptors influences the expression of amphetamine-induced conditioned place preference and amphetamine withdrawal anxiety-like behavior in rats." *Peptides* 33(1): 156-163.
- Kovacs, G. L. and D. H. Versteeg (1993). "Neurohypophysial peptides and brain neurochemistry." *Ann N Y Acad Sci* 689: 309-319.
- Lajtha, A. "Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Behavioral Neurochemistry." *Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology*, Nueva York, Springer, capítulo 12.
- Marcondes, F. K., et al. (2002). "Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations." *Braz J Biol* 62(4A): 609-614.
- Mathews, I. Z. and C. M. McCormick (2007). "Female and male rats in late adolescence differ from adults in amphetamine-induced locomotor activity, but not in conditioned place preference for amphetamine." *Behav Pharmacol* 18(7): 641-650.
- Mathews, I. Z., et al. (2008). "Chronic social stress in adolescence influenced both amphetamine conditioned place preference and locomotor sensitization." *Dev Psychobiol* 50(5): 451-459.
- Olds, J. and P. Milner (1954). "Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain." *J Comp Physiol Psychol* 47(6): 419-427.
- OMS (1992). "Clasificación internacional estadística de enfermedades y problemas relacionados." Genova, Organización Mundial de Salud
- OMS (2005). "Neurociencia del consumo y dependencia de sustancias psicoactivas." Washington D.C., USA, Organización Mundial de la Salud.
- Papp, M., et al. (1992). "Attenuation of place preference conditioning but not place aversion conditioning by chronic mild stress." *J Psychopharmacol* 6(3): 352-356.
- Papp, M., et al. (1991). "An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress." *Psychopharmacology (Berl)* 104(2): 255-259.
- Paul, M. J., et al. (2014). "Sexually dimorphic role for vasopressin in the development of social play." *Front Behav Neurosci* 8: 58.

- Paxinos, G. and C. Watson (2009). "The rat brain in stereotaxic coordinates." Compact sixth edition. Academic Press.
- Pfaus, J. G., et al. (1990). "Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat." *Brain Res* 530(2): 345-348.
- Raggenbass, M. (2008). "Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin." *Eur J Pharmacol* 583(2-3): 243-254.
- Risold, P. Y. and L. W. Swanson (1997). "Connections of the rat lateral septal complex." *Brain Res Brain Res Rev* 24(2-3): 115-195.
- Robinson, T. E., et al. (1980). "Sex differences in amphetamine-elicited rotational behavior and the lateralization of striatal dopamine in rats." *Brain Res Bull* 5(5): 539-545.
- Rodriguez-Borrero, E., et al. (2010). "Arginine vasopressin gene expression changes within the nucleus accumbens during environment elicited cocaine-conditioned response in rats." *Neuropharmacology* 58(1): 88-101.
- Sartor, G. C. and G. Aston-Jones (2012). "Regulation of the ventral tegmental area by the bed nucleus of the stria terminalis is required for expression of cocaine preference." *Eur J Neurosci* 36(11): 3549-3558.
- Sartor, G. C. and G. S. Aston-Jones (2012). "A septal-hypothalamic pathway drives orexin neurons, which is necessary for conditioned cocaine preference." *J Neurosci* 32(13): 4623-4631.
- SENDA (2013). "Décimo Estudio Nacional de Drogas en Población General." Santiago, Chile, Gobierno de Chile.
- Sfikakis, A., et al. (1996). "Stress through handling for vaginal screening, serotonin, and ACTH response to ether." *Pharmacol Biochem Behav* 53(4): 965-970.
- Shapiro, R. A., et al. (2000). "Differential transcriptional regulation of rat vasopressin gene expression by estrogen receptor alpha and beta." *Endocrinology* 141(11): 4056-4064.
- Staiger, J. F. and F. Nurnberger (1991). "The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: projections to the diencephalon and brainstem." *Cell Tissue Res* 264(3): 391-413.
- Szot, P. and D. M. Dorsa (1994). "Expression of cytoplasmic and nuclear vasopressin RNA following castration and testosterone replacement: evidence for transcriptional regulation." *Mol Cell Neurosci* 5(1): 1-10.
- Takamura, Y., et al. (2006). "Spatial firing properties of lateral septal neurons." *Hippocampus* 16(8): 635-644.
- Terner, J. M. and H. de Wit (2006). "Menstrual cycle phase and responses to drugs of abuse in humans." *Drug Alcohol Depend* 84(1): 1-13.
- Tzschentke, T. M. (2007). "Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade." *Addict Biol* 12(3-4): 227-462.

UNODC (2012). "Informe Mundial sobre las Drogas." Viena, Austria, Naciones Unidas.

van Leeuwen, F. and R. Caffè (1983). "Vasopressin-immunoreactive cell bodies in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat." *Cell Tissue Res* 228(3): 525-534.

Wurtz, R. H. and J. Olds (1963). "Amygdaloid Stimulation and Operant Reinforcement in the Rat." *J Comp Physiol Psychol* 56: 941-949.

Young, K. A., et al. (2011). "The role of mesocorticolimbic dopamine in regulating interactions between drugs of abuse and social behavior." *Neurosci Biobehav Rev* 35(3): 498-515.

Zhou, Y., et al. (2005). "Amygdalar vasopressin mRNA increases in acute cocaine withdrawal: evidence for opioid receptor modulation." *Neuroscience* 134(4): 1391-1397.

Zhou, Y., et al. (2011). "Involvement of arginine vasopressin and V1b receptor in alcohol drinking in Sardinian alcohol-preferring rats." *Alcohol Clin Exp Res* 35(10): 1876-1883.