



FACULTAD DE CIENCIAS

LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA Y NEUROFARMACOLOGÍA

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA Y PLASTICIDAD CEREBRAL

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

**“EFECTOS DE LA SENSIBILIZACIÓN CON ANFETAMINA EN RATAS MACHOS Y HEMBRAS:
POSIBLES RELACIONES CON EL SISTEMA VASOPRESINÉRGICO EXTRAHIPOTALÁMICO”**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

CATALINA DANIELA AHUMADA MAYA

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

Co-director de Tesis: **Dr. Ramón Sotomayor-Zárate**

2015

DEDICATORIA

Quisiera dedicar esta tesis a mis padres Daniel y Sandra,

Y a mis inspiraciones, Daniel y Sofía.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al financiamiento del proyecto FONDECYT N° 11140065 de la Dra. Georgina Renard y colaboración del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate por el apoyo durante la realización de esta tesis.

Parte de los resultados de esta tesis han sido presentados en el III Simposio Miguel Ozorio de Almeida realizado en Rio de Janeiro, Brazil y los resultados finales serán presentados en el Congreso en Conjunto de las Sociedades Chilenas de Farmacología, Ciencias Fisiológicas y Neurociencias en Coquimbo, Chile, y el Congreso anual de la Society for Neuroscience, NEUROSCIENCE 2015 en Chicago, Estados Unidos.

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
Círculo de recompensa	10
Sensibilización Locomotora: Un modelo conductual útil para medir los efectos neuroquímicos de una droga	12
Vasopresina: Un neuromodulador relacionado con conductas de motivación y recompensa.	14
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	19
Objetivo General:.....	19
Objetivos Específicos:	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Animales:	20
Registro de la fase del ciclo estral:	20
Sensibilización Locomotora:	21
Fijación de tejido para inmunohistoquímica:	23
Inmunohistoquímica para AVP:	23
Protocolo microdissección del cerebro:.....	24
Enzimo inmunoanálisis (ELISA) para AVP:	25
RT-qPCR de mRNA para AVP.....	26
CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
RESULTADOS	29
Evaluación de las curvas de peso de ratas hembras y machos control y tratadas con AMPH, antes y durante el protocolo de sensibilización.	29
Actividad locomotora en ratas hembras y machos control y tratadas con AMPH durante el período de inducción de la sensibilización.	30

Actividad locomotora inducida por AMPH en ratas hembras y machos control y tratadas durante el día de expresión de la sensibilización.....	31
Actividad locomotora en ratas hembras sensibilizadas con AMPH según la etapa del ciclo estral.	31
Expresión del mRNA de AVP en la MeA de ratas hembras y machos control y sensibilizadas con AMPH.	32
Expresión del mRNA de AVP en MeA de ratas sensibilizadas a AMPH dependiendo de la etapa del ciclo estral al día de la expresión de la sensibilización.	33
Niveles de AVP en el SL de ratas hembras y machos control y tratadas con AMPH.	34
Niveles de AVP en SL dependiendo de la etapa del ciclo estral en ratas sensibilizadas a AMPH.	35
Evaluación de las curvas de ciclo en hembras control y tratadas con anfetamina, antes y durante el protocolo de sensibilización.	35
Imágenes de Inmunohistoquímica de AVP en ratas sensibilizadas a AMPH.....	36
DISCUSIÓN	38
Imágenes de Inmunohistoquímica de AVP en ratas sensibilizadas a AMPH.....	38
Sensibilización locomotora inducida por AMPH en ratas hembras y machos adultas.	38
Actividad Locomotora dependiente del ciclo estral en ratas hembras sensibilizadas.	40
Concentración de AVP en SL y expresión de mRNA de AVP en MeA en ratas hembra y macho adultas.....	41
Concentración de AVP en SL y expresión de mRNA de AVP en MeA en ratas hembras sensibilizadas.	43
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	47

RESUMEN

La drogadicción es una enfermedad caracterizada por la necesidad de consumir drogas a pesar de los efectos adversos que producen. Se ha observado que las mujeres son más vulnerables a estos efectos que los hombres. La amígdala extendida posee proyecciones de vasopresina (AVP) hacia el septum lateral (SL), núcleo implicado en el proceso de adicción. Estas proyecciones regulan varias conductas alteradas por la adicción a drogas de abuso y es conocido que la densidad de proyecciones de AVP al SL es mayor en ratas machos que en hembras. Esto podría relacionar a la AVP con los efectos dependientes del sexo observados en el proceso adictivo. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la sensibilización a anfetamina (AMPH) (paradigma conductual de adicción) sobre el sistema vasopresinérgico extrahipotalámico en ratas hembras y machos. El 75% de los animales tratados con AMPH aumentaron un 20% la actividad locomotora el día 5 con respecto al día 1 de tratamiento (sensibilizadas). Al día de la expresión de la sensibilización las ratas hembras control presentaron una mayor actividad locomotora que los machos. No se observaron diferencias en la cantidad de AVP en SL en las ratas hembras y machos de los distintos grupos, pero si una disminución en la expresión del gen de AVP en la amígdala medial (MeA) en los animales sensibilizados a AMPH. El tratamiento con AMPH en ratas hembras produjo diferencias según la etapa del ciclo estral en la expresión del gen de AVP en la MeA. Nuestros resultados mostraron que tanto en hembras como en machos la sensibilización a AMPH produce una disminución del

mensajero de AVP en la MeA sin demostrarse efectos dependientes del sexo de los animales.

ABSTRACT

EFFECTS OF SENSITIZATION WITH AMPHETAMINE IN MALE AND FEMALE RATS: POSSIBLE RELATIONS WITH DE EXTRA-HYPOTHALAMIC VASOPRESINERGIC SYSTEM

Drug addiction is a disease characterized by the need to use drugs despite adverse effects. It has been observed that women are more vulnerable to these effects than men. Extended amygdala sends vasopressin (AVP) projections to the lateral septum (SL), nucleus involved in the addictive process. These projections regulate several behaviors altered by drug addiction and it is known that the density of AVP fibers in SL is higher in male rats than in females. Therefore, AVP could be related with sex-dependent effects observed in the addictive process. The aim of this work was to study the effects of sensitization to amphetamine (AMPH) (behavioral paradigm of addiction) on the extrahypothalamic vasopressinergic system in male and female rats. 75% of the AMPH-treated animals increased locomotor activity in a 20% on day 5 compared to day 1 of treatment (sensitized animals). At the expression of sensitization day, control female rats showed higher locomotor activity than males. No differences in SL AVP content of control and sensitized female and male rats was observed, but in the medial amygdala (MeA) there was a decrease in AVP gene expression in sensitized animals. AMPH treatment in female rats produced differences depending on phase of the estrous cycle in the AVP gene expression at the MeA. Our results showed that sensitization to AMPH causes a decrease in MeA AVP mRNA in both females and males rats, and we did not find sex-dependent effects in our results.

INTRODUCCIÓN

La drogadicción es una enfermedad crónica recidivante que se caracteriza por la pérdida de control en la ingesta de la droga, y estados emocionales negativos, como disforia, ansiedad e irritabilidad que se exacerban en períodos de abstinencia (Koob et al. 1997). Las drogas de abuso estimulan el circuito de la recompensa en el cerebro generando efectos placenteros en los consumidores (Bobzean et al. 2014). Se cree que la fisiopatología de la adicción está basada en neuroadaptaciones moleculares, genéticas y/o farmacológicas que podrían desarrollar y mantener la adicción a largo plazo (Koob & Volkow 2010).

La Organización Mundial de la Salud informó el 2004 que el 8,9% de la carga total de morbilidad se debe a la adicción a sustancias psicoactivas, del cual el 0,8% corresponde a drogas como, la anfetamina (AMPH), la heroína y la cocaína (OMS 2005). Interesantemente, se ha observado que las mujeres son más propensas al abuso de drogas que los hombres a partir del primer uso ocasional de la droga y también generan una mayor expresión de síntomas negativos producidos por el síndrome de abstinencia (Bobzean *et al.* 2014, Brady & Randall 1999).

Recientemente, en nuestro país el Servicio Nacional de Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA) el 0,9% de la población (14 a 64 años) consume cocaína, el 7,1% marihuana, el 40,8% alcohol y el 21,9% nicotina (SENDA 2013). Estos datos demuestran que nuestra población ha incrementado el consumo de drogas de abuso y surge la necesidad de realizar nuevas investigaciones focalizadas en la búsqueda

de factores de vulnerabilidad que facilitan su consumo y de nuevas terapias farmacológicas que ayuden a tratar la adicción. A continuación se explicará el sustrato neurobiológico de las drogas de abuso.

Circuito de recompensa

El circuito de la recompensa es un circuito neuronal que se activa frente a recompensantes naturales como el sexo (Pfaus *et al.*1990), la comida (Bassareo & Di Chiara 1997) y frente a recompensantes artificiales como las drogas de abuso (Wise RA. 2002 ; Bassareo & Di Chiara 1997). El efecto recompensante se produce a través de la liberación de dopamina (DA) en el núcleo accumbens (Mathews & Mccornick 2007).

Actualmente se sabe que el circuito de la recompensa está constituido principalmente por las proyecciones dopaminérgicas desde el área tegmental ventral (VTA) (Assaf & Miller 1977) hacia el núcleo accumbens, corteza prefrontal (Koob & Volkow 2010) y otras áreas límbicas, como el septum lateral (SL) (Risold & Swanson 1997). Este circuito de la recompensa es regulado por interneuronas GABAérgicas presentes en el VTA, las cuales inhiben la activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Gysling & Wang 1983, Johnson *et al.* 1992) (Fig. 1). Ahora bien no solo se ha descrito una regulación GABAérgica intrínseca en VTA, sino también extrínseca proveniente de otras áreas límbicas como el SL (Staiger & Nurnberger 1991).

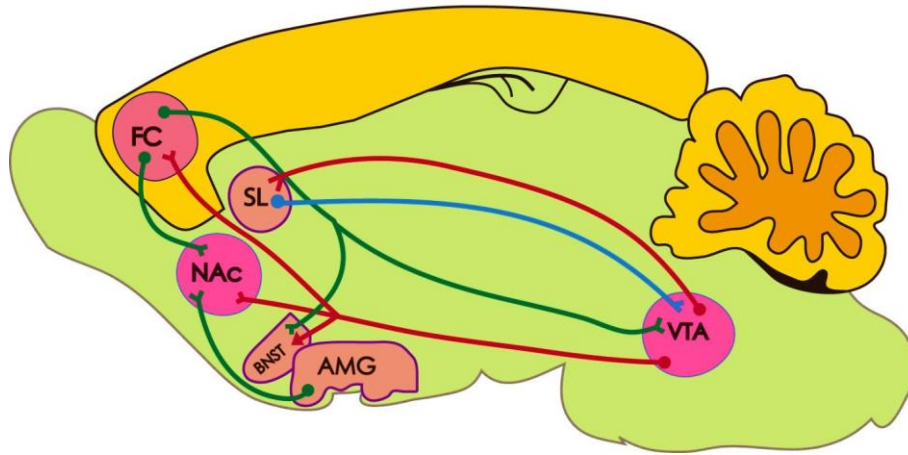


Figura 1. Circuito de la recompensa Mesolímbico. La vía mesolímbica se origina en las neuronas dopaminérgicas (rojo) del VTA. Esta vía proyecta principalmente al núcleo accumbens (NAc), pero también hay proyecciones al lecho de la estría terminal (BNST), septum lateral (SL) y la corteza frontal (FC). VTA, SL y NAc son modulados por abundantes inervaciones de sistemas GABAérgicos (azul) y glutamatérgicos (verde); modificado de Bobzean et al. 2014.

La participación del área septal en procesos recompensantes fue demostrada inicialmente por Olds y Milner quienes observaron que las ratas prefieren autoestimular el área septal del cerebro (Olds & Milner 1954).

Neuroanatómicamente el área septal se divide en dos zonas, una medial (MS) relacionada con procesos cognitivos y otra lateral (SL) que posee una función regulatoria principalmente sobre el hipotálamo. Además, se considera una estación de relevo de información neural hacia otras áreas cerebrales (Sheehan *et al.* 2004). El SL está formado por interneuronas y neuronas de proyección principalmente GABAérgicas (Jakab & Leranth 1990) y se encuentra densamente conectado con otras áreas cerebrales, como hipocampo (memoria), el hipotálamo (homeostasis), la amígdala (emoción), el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) (ansiedad), el VTA (recompensa) y la corteza prefrontal medial (Jakab & Leranth 1990, Staiger & Nurnberger 1991).

En los últimos años se ha analizado el rol del SL en procesos adictivos. Sartor y Aston-Jones han demostrado que la inactivación farmacológica con baclofeno y muscimol (agonistas GABA_B y GABA_A, respectivamente) del SL bloquea el condicionamiento inducido por cocaína, indicando la participación del SL en los efectos recompensantes de la cocaína (Sartor & Aston-Jones 2012). También se ha demostrado que la administración sistémica de AMPH produce un aumento de la actividad neuronal en el área del SL que proyecta al VTA (Colussi-Mas *et al.* 2007), por lo tanto el SL podría estar modulando la sensibilización conductual a AMPH (Colussi-Mas *et al.* 2007). Por otro lado, drogas depresoras del SNC como la morfina producen un aumento en la liberación de DA en el SL debido a una inhibición de las interneuronas GABAérgicas del VTA (Sotomayor-Zarate *et al.* 2005). Interesantemente, se ha observado que la administración sistémica de AMPH no produce un aumento en la liberación de DA en SL debido a un mecanismo indirecto que lleva a la activación de receptores GABA_B que hiperpolarizan los terminales dopaminérgicos (Sotomayor-Zarate *et al.* 2010). Recientemente, se ha demostrado que la abstinencia producida por la administración crónica de AMPH reduce la liberación de DA en el SL de ratas, sugiriendo cambios moleculares en la recaptación vesicular de ésta (Renard *et al.* 2014).

Sensibilización Locomotora: Un modelo conductual útil para medir los efectos neuroquímicos de una droga.

Para evaluar los efectos de las drogas de abuso se utilizan diferentes paradigmas conductuales validados en modelos animales como la preferencia de lugar condicionado

(CPP; utilizado para estudiar el efecto recompensante de las drogas de abuso (Tzschentke 1998)) y la sensibilización locomotora. La sensibilización locomotora es un modelo animal utilizado para determinar el aumento progresivo de la respuesta locomotora a repetidas administraciones de psicoestimulantes (Mathews & Mccornick 2007; Pierce & Kalivas 1997). Éste modelo es útil para predecir el potencial adictivo de drogas, cambios plásticos en redes neuronales y para determinar el potencial farmacológico de nuevas moléculas que afecten el sistema dopaminérgico (Steketee & Kalivas 2011). Es importante recalcar que la sensibilización es un proceso de larga duración (Paulson *et al.* 1991) y su desarrollo se puede separar en dos fases: Iniciación y Expresión. La iniciación es el evento neuronal inmediato en el VTA que induce la sensibilización conductual y la expresión es la consecuencia a largo plazo de estos eventos iniciales y se asocia al NAcc (Steketee & Kalivas 2011).

Interesantemente, se ha observado que tanto en humanos y animales de investigación, que existen diferencias conductuales dependientes del sexo y relacionadas a los efectos recompensantes de las drogas de abuso. Así se demostró que las ratas hembras expresan mayor actividad locomotora que ratas machos frente a una primera exposición a AMPH (Brown *et al.* 2011). Además, en ratas ovariectomizadas (OVX) la administración de AMPH no produce CPP (Silverman & Koenig 2007). Sin embargo, cuando se realiza reemplazo hormonal con estradiol en ratas OVX se reestablece el CPP a AMPH (Silverman & Koenig 2007). También se ha observado que la administración de estradiol incrementa la

actividad locomotora y la sensibilización conductual inducida por cocaína en ratas OVX (Segarra *et al.* 2010).

En roedores adultos, las hembras son más sensibles a la activación locomotora y a los efectos recompensantes de los psicoestimulantes que los machos (Becker *et al.* 2001). Para terminar de comprender estas diferencias sexuales producidas por las drogas de abuso es necesario profundizar más en los mecanismos implicados en el proceso de la adicción.

Vasopresina: Un neuromodulador relacionado con conductas de motivación y recompensa.

El efecto de las drogas de abuso en áreas cerebrales como el SL podría estar modulado por algunos factores capaces de afectar la liberación de DA en el SL. En este sentido, se ha visto que ciertos neuromoduladores como el factor liberador de corticotropina (CRF) (Sotomayor-Zarate *et al.* 2013) y la vasopresina (AVP) (Kovacs & Versteeg 1993) pueden afectar la neuroquímica del SL.

La participación del SL, el BNST y la amígdala medial (MeA) en el proceso adictivo ha sido estudiado, sin embargo el rol del neuropéptido vasopresina (AVP) y su relación con estos núcleos en conductas adictivas no ha sido estudiado. El sistema vasopresinérgico es sexualmente dimórfico (De Vries *et al.* 1983; Caffé *et al.* 1987) y podría estar implicado en las diferencias sexuales observadas en las conductas adictivas y en la vulnerabilidad a desarrollar adicción a drogas psicoestimulantes.

La AVP, conocida como hormona antidiurética (ADH), es una hormona peptídica sintetizada en el hipotálamo, almacenada y secretada en la neurohipófisis (Guyton & Hall 2011) y que principalmente se encarga del equilibrio hídrico del organismo. Sus efectos fisiológicos y celulares 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) en distintos órganos como riñón, hígado, vasos sanguíneos y cerebro. A nivel cerebral participa en diferentes funciones cognitivas como aprendizaje y memoria (Raggenbass 2008, Bychowski *et al.* 2013), y en conductas sociales (Bielsky *et al.* 2005, Caldwell *et al.* 2008). A nivel SNC, la distribución de los receptores V_{1A} es amplia, encontrándose una alta expresión en el SL (Caldwell *et al.* 2008), los cuales se estimulan por AVP proveniente del BNST y la MeA (Allaman-Exertier *et al.* 2007, Paul *et al.* 2014) (Fig. 2). El sistema vasopresinérgico extrahipotalámico posee proyecciones de AVP desde BNST y MeA (Wang *et al.* 1993) que inervan el SL y estas proyecciones difieren según el sexo en ratas adultas (De Vries *et al.* 1984). Por ejemplo, ratas machos tienen dos a tres veces más células AVP positivas que las hembras en el BNST y en MEA (De Vries & AL-SHamma 1990, Wang *et al.* 1993) y se ha observado que desde el día post natal (PND) 12 en adelante, el macho tiene fibras AVPérgicas más densas en el SL que ratas hembras (De Vries *et al.* 1984; De Vries *et al.* 1983). Además, las ratas machos presentan una mayor expresión del receptor V_{1A} que las hembras en SL (Caldwell *et al.* 2008). Por otro lado, las neuronas AVPérgicas parecen ser sensibles a hormonas esteroidales, ya que en machos neonatos castrados se observa una disminución de las proyecciones de AVP en el BNST y MeA en la edad adulta (Wang *et al.* 1993). Mientras que

el reemplazo hormonal con testosterona en ratas hembras y machos neonatos castrados produce un aumento de la densidad de fibras de AVP en el SL (Wang *et al.* 1993). Esto sugiere un patrón sexualmente dimórfico en la densidad de las fibras de AVP encontradas en el SL y en otras áreas cerebrales (Wang *et al.* 1996).

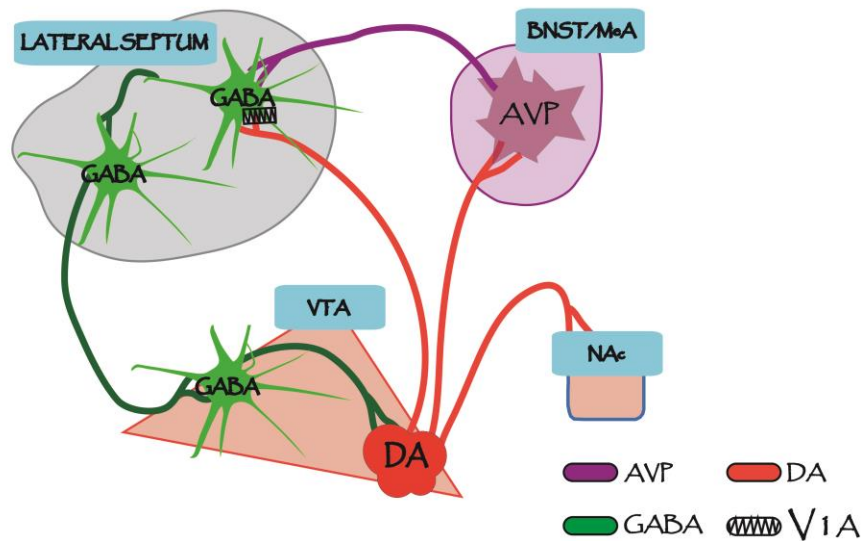


Figura 2. Representación esquemática del neurocircuito vasopresinérgico (AVP) entre el núcleo del lecho de la estria terminal (BNST), amígdala medial (MeA), septum lateral (LS), área tegmental ventral (VTA) y el núcleo accumbens (NAc).

De acuerdo a los antecedentes presentados es porque encontramos interesante estudiar la vulnerabilidad al abuso de drogas para lograr mejorar los tratamientos y disminuir las tasas de recaídas al consumo de drogas. Para esto encontramos necesario entender más a fondo la predisposición a la adicción según el género y la expresión de cambios conductuales asociados. Además es interesante tener en cuenta las alteraciones neuroquímicas producidas por las drogas de abuso en el sistema vasopresinérgico

extrahipotalámico que es sexualmente dimórfico y modula conductas diferentes en machos y hembras.

Es por esto que en esta tesis se propuso estudiar el efecto modulador de la AMPH sobre la expresión de AVP en SL y MeA de ratas machos y hembras que presentan la conducta de sensibilización a AMPH.

HIPÓTESIS

“La sensibilización inducida por anfetamina altera el sistema vasopresinérgico extra-hipotalámico de manera diferencial en ratas machos y hembras”.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Determinar diferencias sexuales en la sensibilización a anfetamina y relacionarla con cambios en el sistema vasopresinérgico extra-hipotalámico.

Objetivos Específicos:

- A. Evaluar la expresión de sensibilización inducida por la administración sistémica repetida de AMPH y la administración sistémica repetida de salino en ratas machos y hembras adultas.
- B. Determinar la expresión del gen de AVP por RT-qPCR en MeA en ratas machos y hembras control y tratadas con AMPH.
- C. Determinar la concentración de AVP en el SL a través de ELISA, en ratas machos y hembras control y tratadas con AMPH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

Se utilizaron ratas machos y hembras Sprague Dawley de aproximadamente 55 a 60 días de edad. Las ratas fueron obtenidas del bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Los animales se mantuvieron en la sala de mantención de animales del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso en un ambiente controlado, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (luz de 8:00 a 20:00), 21 ± 2 °C de temperatura ambiente y humedad relativa (50% aprox.). La comida y el agua se proporcionaron *ad libitum*. Los protocolos experimentales correspondientes al proyecto FONDECYT N° 11140065 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 2 grupos experimentales: 1) Ratas control, que recibieron inyecciones de solución salina isotónica (1 mL/Kg, i.p.); 2) Ratas tratadas con AMPH, que recibieron inyecciones de AMPH (1,5 mg / Kg, i.p.) una vez por día durante el protocolo de sensibilización. En el caso de las hembras, la etapa del ciclo estral se determinó por examen de frotis vaginales (Centola 1978) durante al menos 2 ciclos estrales consecutivos.

Registro de la fase del ciclo estral:

El registro diario de ciclicidad estral se realizó por frotis vaginal tomado diariamente luego el frotis se colecta con una pipeta y se ubica en un portaobjeto (Marcondes *et al.* 2002), se observa en un microscopio óptico la etapa del ciclo (Mathews & McCornick 2007) y

basados en las características citológicas que adopta el epitelio vaginal, se dividen en las siguientes etapas:

- Estro: Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 24 a 48 horas. Es el periodo de receptividad sexual al macho. Citológicamente se caracteriza por presencia de células escamosas (con citoplasma granular), de forma irregular y agrupadas.
- Metaestro o Diestro 1: Duración de 12 a 24 horas. Presencia en el frotis de leucocitos y células escamosas.
- Diestro 2: Etapa del ciclo estral con una duración aproximada de 48 horas y con alta presencia en el frotis de leucocitos.
- Proestro: Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 12 a 24 horas y que citológicamente se caracteriza por presencia de células epiteliales nucleadas, bien redondeadas y solo algunas escamosas de forma irregular.

Sensibilización Locomotora:

El protocolo de sensibilización utilizado en este proyecto se modificó de Herrera *et al.* 2013. La actividad locomotora horizontal se midió utilizando cajas de acrílico (17 cm × 47 cm × 26 cm) colocados en una sala de conducta. Antes de cada inyección las ratas se habituaron a la sala de conducta por 1 hora y a las cajas durante 10 minutos. Las ratas machos y hembras fueron inyectadas con AMPH (1,5 mg/Kg i.p.) o solución salina una vez al día entre las 10:00 a 12:00 h, durante 5 días consecutivos (inducción). Las ratas se colocaron en la caja durante 60 minutos inmediatamente después de la inyección,

mientras fueron grabados por cámaras inalámbricas (Modelo LX-C202, Lynx Security, China). La distancia total (metros) que cada animal recorrió fue utilizada como medida de la actividad locomotora. El criterio para la sensibilización fue un aumento del 20 % en la actividad locomotora durante el día 5 respecto al día 1 del período de inducción de sensibilización (Fuentealba 2010, Casanova *et al.* 2013). El análisis de los vídeos se realizó utilizando el software ANY-Maze (Stoelting Co., IL, USA).

Después del período de inducción de sensibilización locomotora los animales se dejaron en la sala de mantención sin inyecciones durante cuatro días. Cinco días después de finalizado el periodo de inducción, se inyectó a todas las ratas con AMPH (1,5 mg/Kg i.p.) (Grupos control y tratado), y se midió la actividad locomotora como medida de la expresión de sensibilización (Fig. 3).

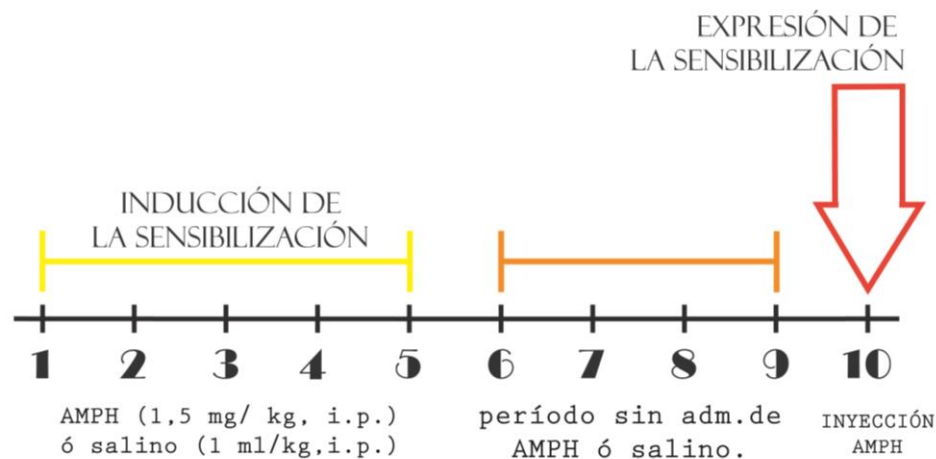


Figura 3. Protocolo de Actividad Locomotora utilizado: día 1 al 5 corresponde al período de inducción de la sensibilización a AMPH, del día 6 al 9 es el período sin administración de AMPH o solución salina, el día 10 o Challenge se administra una dosis de AMPH tanto a los grupos control como a los tratados con AMPH.

Fijación de tejido para inmunohistoquímica:

En un primer grupo de animales (n=9) posterior al protocolo de sensibilización se realizó inmunohistoquímica con el fin de estudiar los posibles cambios en la densidad de las proyecciones que inervan al SL.

Luego de medir la expresión de la sensibilización (última inyección con AMPH), los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (HC: 400 mg/Kg, i.p.) y una vez que los animales estuvieron bajo anestesia profunda fueron perfundidos por vía transcardíaca con solución salina (0,9 % NaCl) seguida de paraformaldehído (PFA) al 4 % en buffer fosfato (PBS: NaH₂PO₄ 0,1 M, NaCl 0,9 %, pH 7.4; solución de fijación). Luego de finalizada la perfusión, los cerebros fueron removidos y se fijaron durante la noche en PFA al 4 % en PBS y posteriormente se almacenaron a 4 °C en una solución de sacarosa al 20 % en PBS. La inmunomarcación se llevó a cabo en secciones flotantes. Se utilizó un criostato semi-automático (modelo KD-2950, Kedee, China) para obtener secciones coronales de 30 µm y con la guía de un atlas de cerebro de rata (Paxinos & Watson 2009) se seleccionaron aquellas que contenían el SL.

Inmunohistoquímica para AVP:

Antes de comenzar con la inmunotinción, las secciones coronales seleccionadas se colocaron en una solución al 3% de H₂O₂ en PBS 0,01 M durante 30 minutos para bloquear la peroxidasa endógena del tejido. A continuación, se incubaron en una solución al 10% v/v de suero de caballo normal (NHS) durante 1 h para bloquear los sitios de unión

inespecífica. Luego, las secciones de cada cerebro fueron incubadas durante 48 horas a 4°C con el anticuerpo primario anti-vasopresina (anticuerpo policlonal de conejo anti-vasopresina: AB1565, Chemicon Internacional) en una dilución de 1:10.000. Luego de ser lavadas con PBS 0,01 M, se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (anticuerpo anti-inmunoglobulina G anti-conejo). Posteriormente se incubaron los cortes con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain® ABC kits, Vector, USA) durante 1 h a temperatura ambiente para amplificar la señal. La inmunoreactividad citoplasmática de AVP fue detectada con diaminobencidina (DAB), que al reaccionar produce un producto de color marrón. Por último, las secciones se montaron en portaobjetos, se secaron al aire durante la noche y se colocó un cubreobjetos con medio de montaje Eukitt (Sigma & Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las secciones del cerebro con la inmunomarca para AVP fueron visualizadas en un microscopio (Modelo BA210, Motic, Italia) acoplado a una cámara de fotos de 2 megapíxeles.

Protocolo microdissección del cerebro:

Otro grupo de animales se utilizó para microdisectar el SL (Bregma +0,2 a -0,4 mm) para medir el contenido total de AVP y microdisectar la MeA (Bregma -2,1 a -3,6 mm) para cuantificar los niveles del mRNA de AVP. Luego de medir la expresión de la sensibilización los animales fueron decapitados con una guillotina para animales pequeños. Posteriormente se procedió a extraer el cerebro y con ayuda de un atlas de cerebro de rata (Paxinos & Watson 2009) se microdissectaron y pesaron.

Enzimo inmunoanálisis (ELISA) para AVP:

Para medir los niveles de AVP utilizando un kit comercial de ELISA (Vasopressin ELISA (AVP/ADH) No. 74-VSPHU-E05, ALPCO) el SL fue previamente tratado con un volumen equivalente al peso de la muestra de ácido tricloroacético (inhibidor de proteasas) y homogeneizado. 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, se realizó speedVac y se reconstituyó la muestra con el buffer assay. La placa del kits cuenta con el anticuerpo primario específico adherido. En cada pocillo se agregó el calibrador, el control y la muestra que se analizó en duplicado. Posteriormente a cada pocillo se le agregó el conjugado de fosfatasa alcalina unido a vasopresina y se agregó el anticuerpo policlonal de conejo para vasopresina se mezcló e incubó a 4°C por 24 horas. Posteriormente se agregó una solución de p-nitrofenil fosfatasa en buffer y se incubó a 37°C por 1 hora. Finalmente se agregaron 50 µL de la solución de "stop" en cada pocillo y se leyó la placa en un lector a 405 nm dentro de los primeros 20 minutos. Los datos de las muestras se interpolaron en la curva de calibrado donde se obtuvo la concentración de AVP en cada muestra. La intensidad del color que se formó es inversamente proporcional a la concentración de AVP en la muestra.

RT-qPCR de mRNA para AVP

Extracción de RNA total: El RNA total de la muestra de MeA se extrajo a través de RNeasy Mini Kit (Catálogo N°74104, Qiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de RNA total: Se cuantificó 1,5 µL 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 siguientes.

RT-qPCR: La preparación del templado de cDNA y mRNA se llevó 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. Cuatro 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, 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 de 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 de 50 ciclos en un Real-Time PCR Detection System CFX96 Touch™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

La reacción de amplificación para AVP se realizó a 50 ciclos, a 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. Para la normalización de la expresión del mRNA de AVP, se midió el mRNA 18S ribosomal en cada protocolo. La reacción de amplificación para 18S 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. Tubos de reacción sin la enzima RT fueron usados como controles negativos del PCR. Los productos de PCR fueron detectados por medio de la fluorescencia de la unión del SYBR Green al producto de PCR, donde el aumento de la intensidad de fluorescencia fue proporcional a la cantidad del amplicón producido en cada ciclo. Se determinó la razón de expresión entre el gen AVP versus 18S y se analizó el nivel de expresión de estos.

Gen	N° acceso	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
AVP	NM_016992.2.	TGC-CTG-CTA-CTT-CCA-GAA-CTG-C	AGG-GGA-GAC-ACT-GTC-TCA-GCT-C
18S	X01117	TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG	GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA

Análisis de datos del gen de AVP: Para analizar las muestras de MeA, se realizó una curva de calibrado a diferentes concentraciones con un pool de cDNA de las muestras de MeA del gen de AVP y 18S para el grupo tratado con AMPH y control, se determinó la eficiencia de la amplificación de ambos genes, según la fórmula de % Eficiencia. Las muestras se normalizaron a una concentración de 10 ng/20uL, posteriormente se realizó el PCR por duplicado y se obtuvieron los Ct de cada muestra, se calculó el Log de cada gen y el antilog para obtener la concentración de cada uno, finalmente se relacionó la expresión del gen de AVP y 18S de acuerdo a la fórmula ΔCq para el grupo tratado y control.

$$\% \text{ Eficiencia} = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$$

$$\Delta Cq \ 1 = Cq \ (\text{Target Gen-treated}) - Cq \ (\text{Ref Gen-treated})$$

$$\Delta Cq \ 1 = Cq \ (\text{VP-AMPH}) - Cq \ (\text{18S-AMPH})$$

CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

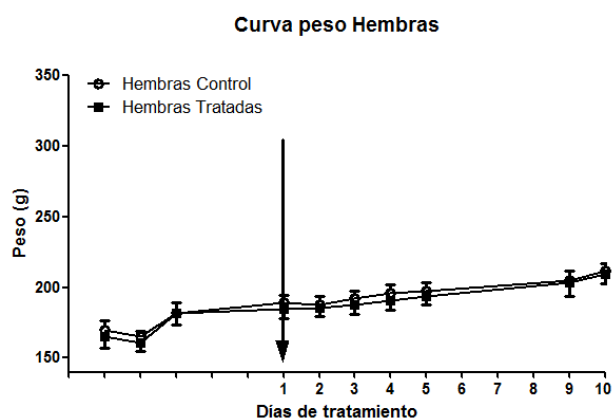
Los resultados son expresados como valor promedio \pm error estándar medio (SEM). Las figuras que muestran el curso temporal de actividad locomotora (medida como distancia recorrida) fueron analizadas por análisis de varianza ANOVA de dos vías seguido por un post-test Bonferroni. La diferencia estadísticamente 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

Evaluación de las curvas de peso de ratas hembras y machos control y tratadas con AMPH, antes y durante el protocolo de sensibilización.

No se observan cambios estadísticamente significativos en las curvas de ganancia de peso de animales control y tratados con anfetamina tanto en hembras (Fig.4 A) como en machos (Fig.4B).

A



B

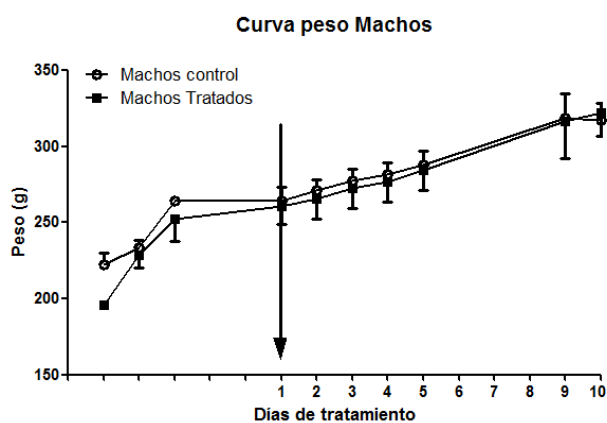


Figura 4. Curvas de peso de ratas hembra (A) y macho (B) de los grupos control y tratamiento de AMPH. Hembras control n=11, Hembras AMPH n=11, Machos control n=7, Machos AMPH n=7.

Actividad locomotora en ratas hembras y machos control y tratadas con AMPH durante el período de inducción de la sensibilización.

En la figura 5 se observa la actividad locomotora de ratas hembra y macho control y tratadas con AMPH durante el período de inducción de sensibilización. El grupo de animales tratados con AMPH se separó en animales sensibilizados y no sensibilizados según el criterio de sensibilización establecido en esta tesis (aumento del 20% de la locomoción respecto del día 5 al día 1). El 75% de los animales tratados con AMPH sensibilizaron: 11 de 14 hembras y 7 de 9 machos. Se observa que las ratas no sensibilizadas presentan una mayor actividad locomotora frente a una primera dosis de AMPH en comparación con los animales sensibilizados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa sólo en hembras (Fig. 5).

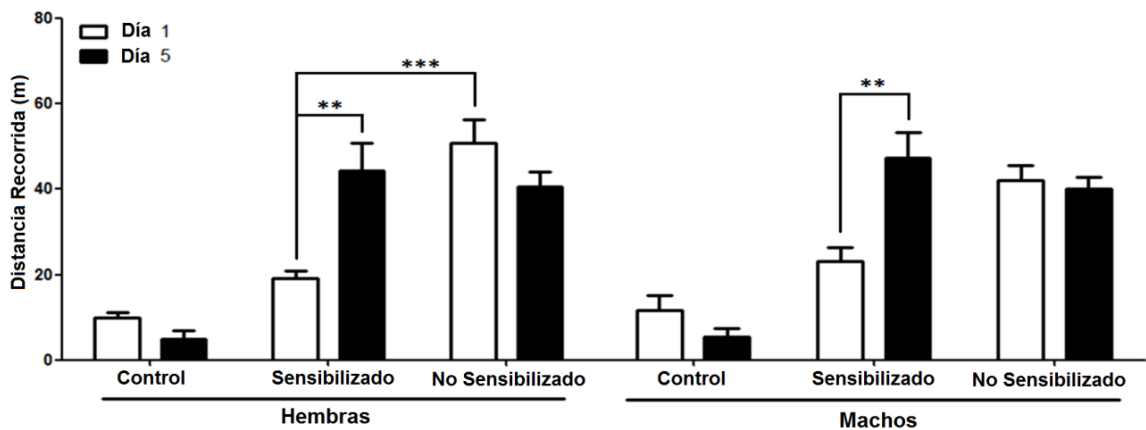


Figura 5. Actividad locomotora expresada en distancia recorrida en metros de ratas hembras y machos control y tratadas con AMPH al día 1 y 5 del proceso de inducción de la sensibilización locomotora. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Hembras Control $n=11$, Hembras Sensibilizadas $n=11$, Hembras No Sensibilizadas $n=3$; Machos Control $n=7$, Machos Sensibilizados $n=7$, Machos No Sensibilizados $n=2$.

Actividad locomotora inducida por AMPH en ratas hembras y machos control y tratadas durante el día de expresión de la sensibilización.

Se observa que las hembras tienen una mayor locomoción en comparación con los machos control a la primera dosis de AMPH el día de la expresión de la sensibilización (día 10) (Fig.6).

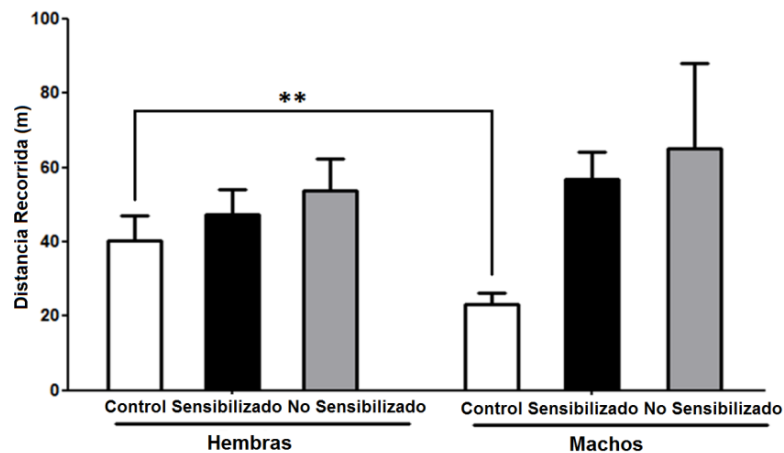


Figura 6. Actividad locomotora expresada en distancia recorrida en metros de ratas hembras y machos control y tratadas con AMPH al día 10 del protocolo como medida de la expresión de la sensibilización locomotora. $**p < 0.01$. Hembras Control $n=11$, Hembras Sensibilizadas $n=11$, Hembras No Sensibilizadas $n=3$; Machos Control $n=7$, Machos Sensibilizados $n=7$, Machos No Sensibilizados $n=2$.

Actividad locomotora en ratas hembras sensibilizadas con AMPH según la etapa del ciclo estral.

No se observan diferencias significativas en la locomoción de ratas sensibilizadas entre las diferentes etapas del ciclo estral.

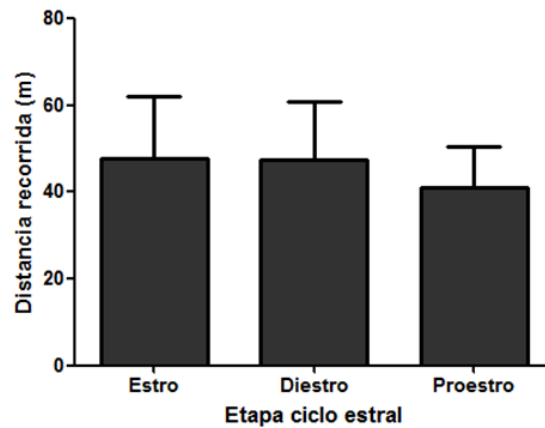


Figura 7. Actividad Locomotora expresada en distancia recorrida en metros según la etapa del ciclo estral de hembras al día 5 del protocolo de actividad locomotora. Hembras Estro $n=2$, Hembras Diestro $n=3$, Hembras Proestro $n=3$.

Expresión del mRNA de AVP en la MeA de ratas hembras y machos control y sensibilizadas con AMPH.

En la figura 8 se observa que los niveles de RNA mensajero de AVP disminuyen en las ratas sensibilizadas con AMPH de ambos sexos con respecto a sus respectivos grupos control.

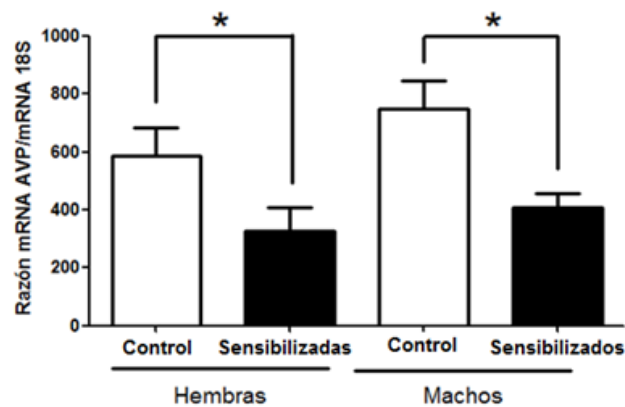
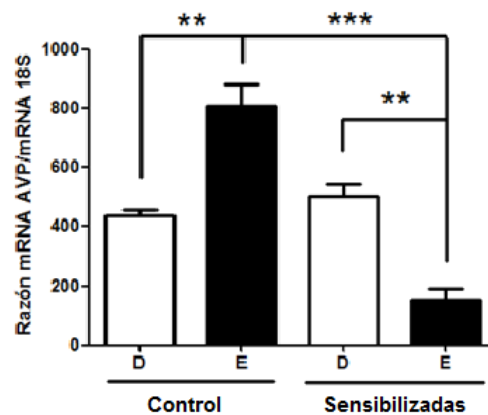


Figura 8. Expresión de mRNA AVP en la amígdala medial (MeA) de ratas control y tratadas con anfetamina en ratas hembra y macho. $*p<0.05$. Hembras Control $n=5$, Hembras Sensibilizadas $n=6$; Machos Control $n=4$, Machos Sensibilizados $n=4$.

Expresión del mRNA de AVP en MeA de ratas sensibilizadas a AMPH dependiendo de la etapa del ciclo estral al día de la expresión de la sensibilización.

En la figura 9 A podemos observar que en las hembras control la expresión de mRNA de AVP es mayor en los animales que se encuentran en la etapa de estro del ciclo estral al día 10 de tratamiento en comparación con las hembras control en la etapa de diestro. Sin embargo, en los animales sensibilizados el mRNA de AVP en la MeA disminuye en hembras que se encuentran en la etapa de estro al día 10 de tratamiento en comparación con las hembras en diestro. Sólo en las hembras que se encuentran en estro disminuye la expresión del mRNA de AVP en la MeA luego del tratamiento con AMPH (Fig.9A). En cuanto la actividad locomotora inducida por AMPH de las hembras control y sensibilizadas dependiendo de la etapa del ciclo estral que se encuentran al día 10 de tratamiento (Fig.9B), no se observan diferencias significativas entre los grupos.

A



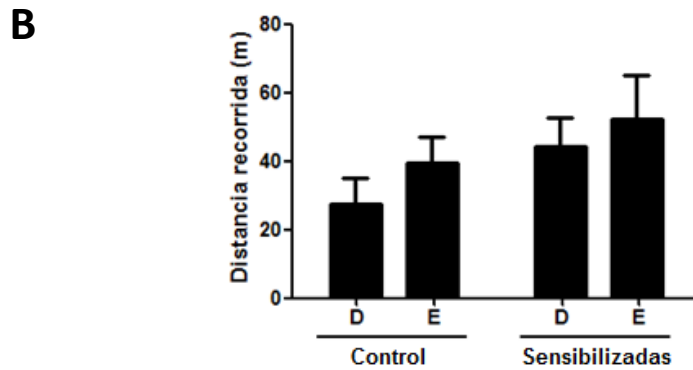


Figura 9. Expresión de mRNA AVP en la amígdala medial (MeA) (A) y actividad locomotora de ratas control y tratadas con anfetaminas dependiendo de la etapa del ciclo estral (B). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Hembras Control en Diestro $n=3$, Hembras Control en Estro $n=2$; Hembras Sensibilizadas en Diestro $n=3$, Hembras Sensibilizadas en Estro $n=2$.

Niveles de AVP en el SL de ratas hembras y machos control y tratadas con AMPH.

No se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de AVP presentes en el SL de ratas control y sensibilizadas con AMPH tanto en hembras como en machos (Fig.10). Sin embargo, se observa una tendencia al aumento en los niveles de AVP en el SL de machos tratados con AMPH.

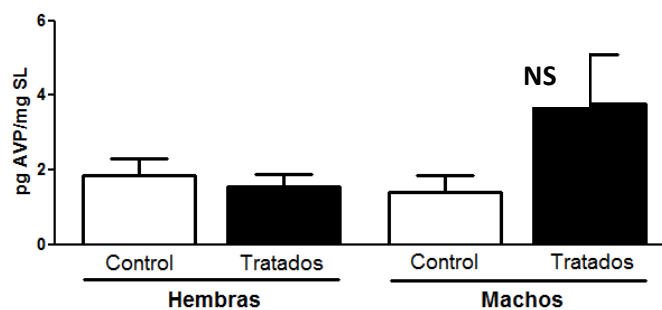


Figura 10. Niveles de AVP expresados en pg/mg de tejido de Septum Lateral (SL) de ratas hembra y macho control y tratadas con anfetamina. NS: no significativo. Hembras Control $n=4$, Hembras Sensibilizadas $n=5$; Machos Control $n=4$, Machos Sensibilizados $n=4$.

Niveles de AVP en SL dependiendo de la etapa del ciclo estral en ratas sensibilizadas a AMPH.

No se observan diferencias significativas en los niveles de AVP en SL dependiendo de la fase del ciclo estral en hembras sensibilizadas.

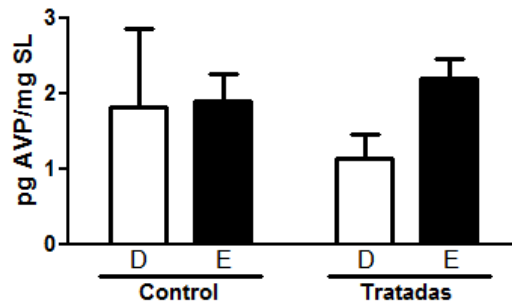


Figura 11. Niveles de AVP expresados en pg/mg de tejido de Septum Lateral (SL) dependiendo de la etapa del ciclo estral de ratas sensibilizadas. Hembras Control en Diestro n=2, Hembras Control en Estro =2; Hembras sensibilizadas en Diestro n=3, Hembras Sensibilizadas en Estro n=2.

Evaluación de las curvas de ciclo en hembras control y tratadas con anfetamina, antes y durante el protocolo de sensibilización.

Como se puede observar en la figura 12, el tratamiento con anfetamina no alteró el ciclo estral en las hembras tratadas.

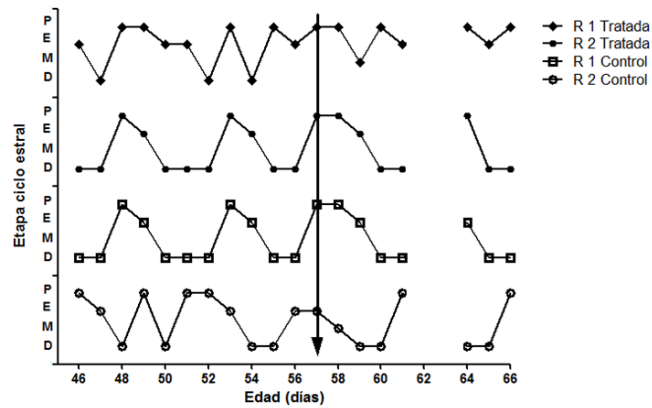


Figura 12. Curvas representativas del ciclo estral de 2 ratas hembras control y 2 tratadas con AMPH.

Imágenes de Inmunohistoquímica de AVP en ratas sensibilizadas a AMPH.

El análisis semicuantitativo de las fotografías no se llevó a cabo, ya que a pesar que la técnica se realizó correctamente porque se observaron neuronas vasopresinérgicas en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Fig. 14 E), en el Septum lateral no se observaron fibras vasopresinérgicas (Fig. 13 D).

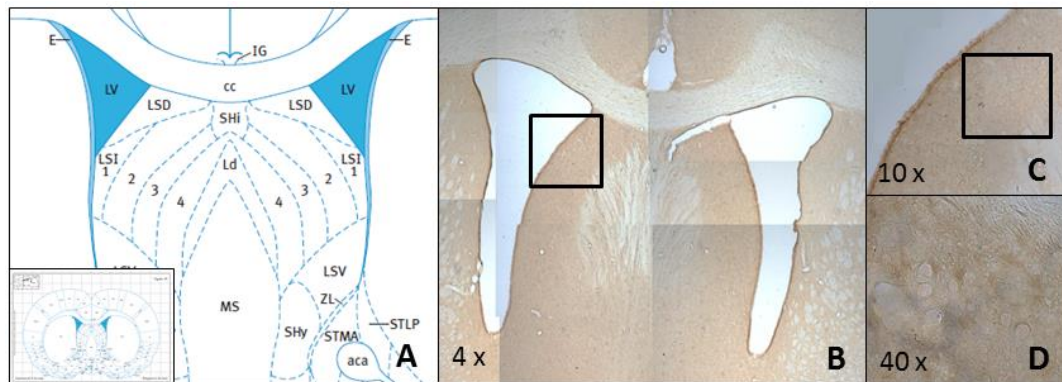


Figura 13. (A) Esquema de cerebro de rata sacado del atlas de Paxinos y Watson (bregma 0,36 mm) donde se observa la localización del SL (LSD: septumlateral dorsal, LSI: septum lateral intermedio, LSV: septum lateral ventral); (B) inmunohistoquímica a corte de cerebro a rata hembra tratada con AMPH; (C) área de septum lateral a 10x; (D) área de septum lateral a 40x.

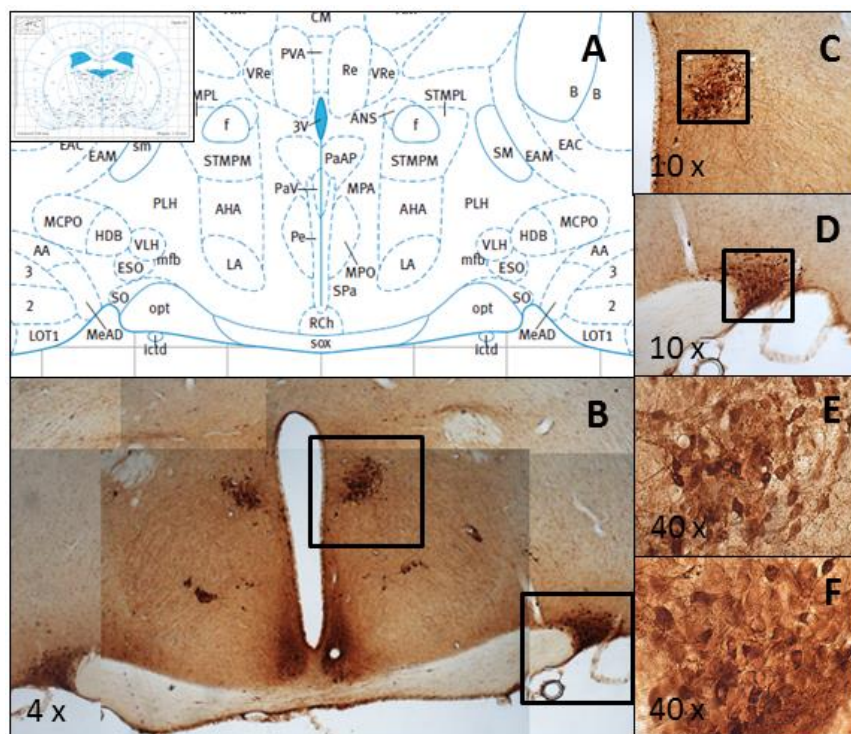


Figura 14. (A) Esquema de corte de cerebro de rata según atlas de cerebro de rata Paxinos y Watson (bregma -1,32 mm) donde se puede observar la ubicación del núcleo paraventricular (PaAP) y núcleo supraóptico (SO); (B) inmunohistoquímica a corte de cerebro a rata hembra tratada con AMPH; (C) área de PaAP a 10x; (D) área de SO a 10x; (E) área de PaAP a 40x; (F) área de SO a 40x.

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió los efectos de la sensibilización a AMPH en ratas hembras y machos sobre el sistema vasopresinérgico extra-hipotalámico. Nuestros resultados demostraron que las ratas hembras como los machos expresan el mismo nivel de sensibilización, observando leves diferencias conductuales entre los sexos. A nivel central la sensibilización a AMPH produjo una disminución similar en el mRNA de AVP en la MeA en ambos sexos. En cuanto a los niveles AVP en SL se observa una tendencia al aumento en ratas machos tratadas con AMPH.

Imágenes de Inmunohistoquímica de AVP en ratas sensibilizadas a AMPH.

Debido a la baja concentración de AVP en zonas extrahipotalámicas, para poder observarlo por inmunohistoquímica hay que realizar un pretratamiento de los animales con colchicina o utilizar un anticuerpo específico que sea capaz de marcar los péptidos que se encuentran a muy bajas concentraciones. La colchicina se utiliza en inmunohistoquímica porque permite la cuantificación de péptidos de baja concentración (Van Leeuwen & Caffé 1983; Caffé & Van Leewen 1983) al bloquear el transporte axonal de AVP (Dahlstrom 1968) permitiendo su acumulación.

Sensibilización locomotora inducida por AMPH en ratas hembras y machos adultos.

El abuso de drogas depende de factores que influyen la iniciación, mantención y reinstalación del consumo de drogas (Mathews & Mills 2008), como factores estresantes u

hormonas circulantes y estos podrían definir la vulnerabilidad al abuso y adicción. Se ha observado que ratas hembras adolescentes poseen una mayor sensibilización locomotora a psicoestimulantes y por lo tanto serían más vulnerables al abuso de drogas (Wu & Schlenger 2003). Esto es consistente con estudios realizados en humanos donde se ha visto que en adolescentes y especialmente mujeres que consumen estimulantes son más propensas a la dependencia de drogas (Wu & Schlenger 2003) y poseen más problemas de abuso que los hombres (Kosten 1993). A pesar que son más hombres que mujeres los consumidores de drogas de abuso (Brady & Randall 1999).

Sin embargo, nuestros resultados muestran que aproximadamente el 75% de los animales, tanto hembras como machos sensibilizan a AMPH. Se sabe que la actividad locomotora en respuesta a inyecciones repetidas de solución salina fisiológica generalmente se mantienen constante durante los días de tratamiento (5 días), mientras que la actividad locomotora a tratamientos repetidos de psicoestimulantes aumenta (Mathews & McCornick 2007).

Nuestras ratas no sensibilizadas muestran una mayor actividad locomotora que los animales sensibilizados al primer día de la inyección de AMPH. Se ha observado que ratas con una alta locomoción en respuesta a un ambiente nuevo muestran una mayor locomoción (high- responders) a una administración inicial de AMPH y mayor auto-administración a AMPH (Scholl *et al.* 2009). También se ha descrito que los animales no sensibilizados estarían des-sensibilizados al tratamiento al habituarse a los efectos conductuales de la administración repetida de anfetamina (Scholl *et al.* 2009). Según

Scholl y col, se describe que las ratas no sensibilizadas presentarían un estado intermedio entre los animales controles tratados con solución salina y las ratas sensibilizadas a AMPH (Scholl *et al.* 2009).

Al día de la expresión de la sensibilización (día 10 del protocolo de sensibilización), nuestros resultados muestran que la actividad locomotora en las ratas hembras control fue mayor que en ratas machos control. Las ratas control presentaron su primera dosis de AMPH al día de la expresión de la sensibilización y se ha visto que las hembras expresan una mayor actividad locomotora frente a una primera exposición a AMPH que ratas machos (Brown *et al.* 2011). Además, se ha observado que tanto ratas hembras como machos bajo estímulos estresantes presentan una mayor respuesta locomotora con administraciones agudas de AMPH (Mccornick *et al.* 2005).

Actividad Locomotora dependiente del ciclo estral en ratas hembras sensibilizadas.

En estudios anteriores no se ha encontrado diferencia en la sensibilización locomotora entre ratas en diestro o estro (Diaz-Véliz *et al.* 1994; Milesi-Hallé & McMillan 2007), así como nosotros tampoco encontramos diferencias en la sensibilización en ratas que se encuentran en distintas etapas del ciclo estral al comienzo y al final del protocolo.

Además se ha observado que el ciclado de hembras bajo tratamientos adictivos produciría un estrés extra asociado al estudio, es por esto que existen estudios que prefieren no controlar el ciclo estral de las ratas hembras porque las variaciones de hormonas sexuales

circulantes podrían afectar los efectos producidos por la AMPH y la realización del frotis vaginal puede disminuir la actividad inducida por el psicoestimulante (Walker *et al.* 2002). Por lo tanto los resultados obtenidos en los test conductuales no serían comparables con lo obtenido en machos.

En el paradigma conductual CPP se ha observado que ratas hembras en diestro presentan mayor CPP (> 60% de permanencia en la caja relacionada con AMPH) a AMPH que las que se encuentran en estro-proestro de la fase del ciclo estral (McCornick *et al.* 2007). Cabe destacar que si bien sensibilización locomotora inducida por psicoestimulantes y el CPP difieren en los circuitos neuronales implicados en el establecimiento de ambos paradigmas conductuales (Mathews & Mills 2008).

Concentración de AVP en SL y expresión de mRNA de AVP en MeA en ratas hembra y macho adultas.

Desde hace tiempo se conoce que los machos presentan una mayor densidad de fibras vasopresinérgicas que proyectan al SL que las hembras (De Vries *et al.* 1983) y mayor expresión del receptor V_{1A} en el área septal (Ostrowski *et al.* 1992). Además, se ha observado que la expresión del gen de AVP en zonas del circuito vasopresinérgico extrahipotalámico como la MeA es regulada por testosterona (Szot & Dorsa 1994; Wang & De Vries 1995).

Sin embargo, en nuestros resultados no se observaron diferencias significativas entre ambos sexos en la expresión del mRNA de AVP, pero si entre tratamientos, observando una disminución del mensajero de AVP en las ratas hembras y machos tratadas con

AMPH. En cuanto a la cantidad de AVP no se observaron diferencias significativas en ambos sexos, pero existe una tendencia de mayor cantidad en los machos tratados.

Esto podría relacionarse con que hormonas sexuales masculinas disminuyen los efectos producidos por AMPH y cocaína, mientras que hormonas femeninas aumentarían estos efectos (Becker *et al.* 1984). Cabe considerar que nuestras hembras estuvieron en Diestro y Estro donde los niveles de estrógeno se encuentran cercanos al basal en ambas etapas y la progesterona se encuentra más elevada en Diestro que en Estro.

Se ha observado que ratas hembras y machos gonadectomizadas disminuyen las fibras de AVP que inervan desde el BNST y la MeA, pero sin observar diferencias en el sistema vasopresinérgico hipotalámico de neuronas magnocelulares del PVN y el núcleo supraóptico (De Vries 1984, De Vries 1985). También se ha observado que en ratas castradas disminuyen las proyecciones de AVP en BNST y MeA, lo que produciría un debilitamiento del reconocimiento social (Bluthe *et al.* 1990).

En cuanto a tratamientos con drogas de abuso, se ha observado que existe un aumento del gen de AVP en abstinencia subaguda a cocaína (1 día), pero no en abstinencia crónica a la misma droga (10 días) (Zhou *et al.* 2005). Es por eso que los resultados podrían verse alterados dependiendo del tiempo del tratamiento, dosis utilizada y periodo de abstinencia antes del challenge además de los factores fisiológicos antes mencionados.

Concentración de AVP en SL y expresión de mRNA de AVP en MeA en ratas hembras sensibilizadas.

Las mujeres experimentan más efectos positivos por el consumo de drogas durante la fase folicular del ciclo menstrual cuando está más alto el estradiol (Evans *et al.* 2002).

Se ha observado que las proyecciones desde el BNST y MeA son más sensibles a los efectos de hormonas esteroidales gonadales (De Vries *et al.* 1984). Los estrógenos se asocian con un aumento de la actividad dopaminérgica (Di Paolo *et al.* 1988) y con acción opuesta al estrógeno, la progesterona tiene un efecto bloqueador en el sistema dopaminérgico estriatal (Fernández-Ruiz *et al.* 1990) por lo tanto disminuiría el efecto de la AMPH. También se ha observado que la administración de progesterona exógena puede suprimir la acción de neuronas vasopresinérgicas en los sitios de proyección del BNST y MeA, como SL y la habénula lateral (Auger & Vanzo 2006).

El receptor de progesterona se encuentra en casi todas las neuronas vasopresinérgicas principalmente en BNST y MeA (Auger & De Vries 2002) y sabemos que la AVP es influenciada principalmente por testosterona mediada por la activación del receptor de andrógeno (De Vries & Sodersten 2009).

Nuestros resultados mostraron que la expresión de mRNA de AVP en ratas hembras sensibilizadas es diferente dependiendo de la etapa del ciclo estral, entre los grupos de tratamiento en diestro y estro. La principal diferencia ocurre en estro donde los niveles de estradiol están en su nivel basal, pero en esta etapa la progesterona disminuye progresivamente. Además se ha visto que dosis agudas de AMPH aumentarían los niveles

plasmáticos de progesterona y testosterona (Budziszewska *et al.* 1996) y de esta manera podría modular la expresión de AVP. Esto podría relacionarse con que hormonas sexuales femeninas aumentan los efectos inducidos por anfetamina y cocaína, en cambio hormonas masculinas disminuyen estos efectos (Becker *et al.* 1984).

La cuantificación de AVP en SL no demuestra ninguna diferencia significativa dependiendo del ciclo estral en hembras sensibilizadas. Es importante considerar que la inervación vasopresinérgica al SL proviene de la MeA pero también del BNST, y ambos núcleos podrían responder de manera diferente frente a las drogas de abuso.

La sensibilización a AMPH produjo una disminución en el mRNA de AVP en la MeA en animales sensibilizados machos y hembras. Este núcleo es parte de un sistema que regula diferentes conductas como agresividad, memoria social y ansiedad, por lo que las drogas de abuso podrían alterar estas conductas a través de la modulación de este sistema. Al estudiar otros núcleos vasopresinérgicos afectados por la AMPH y observando si presentan diferencias sexuales en la modulación podríamos contribuir a determinar los factores que podrían definir la vulnerabilidad al abuso de drogas y conocer los cambios en la maquinaria neuronal que modificaría el funcionamiento de circuitos neuronales que a su vez se traduciría en el desarrollo de conductas de tipo adictivas.

CONCLUSIONES

1. La administración repetida de AMPH produce una sensibilización de alrededor del 75% de ratas hembra y macho adultas.
2. La administración repetida de AMPH en las hembras no sensibilizadas, produce una mayor actividad locomotora al primer día de tratamiento en comparación con hembras sensibilizadas.
3. La administración de AMPH al día de la expresión de la sensibilización en ratas control produce una mayor actividad locomotora en ratas hembras que en machos.
4. La administración repetida de AMPH en hembras sensibilizadas no produce diferencias en la actividad locomotora dependiendo de la etapa del ciclo estral en el proceso de sensibilización.
5. La administración repetida de AMPH produce una disminución de la expresión del gen de AVP en los animales tratados con AMPH en comparación con el grupo control, pero no hay diferencias entre sexos en la expresión del gen de AVP.
6. La administración repetida de AMPH produce una disminución de la expresión del gen de AVP en ratas hembras sensibilizadas que se encuentran en estro en comparación con el grupo control.
7. La administración repetida de AMPH no produce diferencias en la cantidad de AVP en SL de ratas hembras y machos adultas en comparación con el grupo control.

8. La administración repetida de AMPH no produce diferencias en la cantidad de AVP en SL de ratas hembra sensibilizadas dependiendo de la etapa del ciclo estral en que se encuentren comparada con las hembras control.

BIBLIOGRAFÍA

- Allaman-Exertier, G., Reymond-Marron, I., Tribollet, E. and Raggenbass, M. (2007) Vasopressin modulates lateral septal network activity via two distinct electrophysiological mechanisms. *Eur J Neurosci*, **26**, 2633-2642.
- Assaf, S. Y. and Miller, J. J. (1977) Excitatory action of the mesolimbic dopamine system on septal neurones. *Brain Res*, **129**, 353-360.
- Auger C.J. and Vanzo R.J. (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**, 187-194.
- Auger C.J., De Vries G.J. (2002) Progesterin receptor immunoreactivity within steroid-responsive vasopressin immunoreactive cells in the male and female rat brain. *J Neuroendocrinol*, **14**, 561-567.
- Bassareo V. and Di Chiara G. (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**, 851-861.
- Becker J.B, Molenda H. and Hummer D. (2001) Gender differences behavioral responses to cocaine and amphetamine: Implications for mechanisms mediating gender differences in drug abuse. *Annals of NY academy of Sciences*, **937**, 172-187.
- Becker J.B., Beer M., Robinson T.(1984) Striatal dopamine release stimulated by amphetamine or potassium: influence of ovarian hormones and the light-dark cycle. *Brain research*, **311**, 157-160.
- Bielsky, I., Hu, S., Ren, X., Terwilliger, E. and Young, L., (2005) The V1a Vasopressin Receptor Is Necessary and Sufficient for Normal Social Recognition: A Gene Replacement Study. *Neuron*, **47**, 503-513.
- Bluthe R.M., Schoenen J., Dantzer R. (1990) Androgen-dependent vasopressinergic neurons are involved in social recognition in rats. *Brain research*, **519**, 150-157.
- Bobzean, S., Denobrega and A., Perrotti, L.(2014) Sex differences in the neurobiology of drug addiction. *Exp Neurol*, In press.
- Brady K.T. and Randall C.L. (1999) Gender differences in substance use disorders. *Psychiatr Clin North Am*, **22**, 241-251.
- Brown R.W., Perna M.K., Noel D.M. et al. (2011) Amphetamine locomotor sensitization and conditioned place preference in adolescent male and female rats neonatally treated with quinpirole. *Behav Pharmacol*, **22**, 374-378.

Budziszewska B., Jaworska-Feil L. and Lason W. (1996) The effect of repeated amphetamine and cocaine administration on adrenal, gonadal and thyroid hormone levels in the rat plasma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **104**, 334-338.

Bychowski, M. E., Mena, J. D. and Auger, C. J. (2013) Vasopressin infusion into the lateral septum of adult male rats rescues progesterone-induced impairment in social recognition. *Neuroscience*, **246**, 52-58.

Caffé A.R., Van Leeuwen F.W. and Luiten P.G., (1987) Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. *J Comp Neurol*, **261**, 237-252.

Caffé, R. and Van Leeuwen, F.W. (1983) Vasopressin immunoreactive cells in the dorsomedial hypothalamic region, medial amygdaloid nucleus and locus coeruleus of the rat. *Cell Tissue Res*, **233**, 23-33.

Caldwell, H. K., Lee, H. J., Macbeth, A. H. and Young, W. S., 3rd (2008) Vasopressin: behavioral roles of an "original" neuropeptide. *Prog Neurobiol*, **84**, 1-24.

Casanova J.P., Velis G.P., Fuentealba J.A. (2013) Amphetamine locomotor sensitization is accompanied with an enhanced high K(+)-stimulated Dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Behavioural brain research*, **237**, 313-317.

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**, 553-561.

Colussi-Mas, J., Geisler, S., Zimmer, et al. (2007) Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double-labelling study. *European Journal of Neuroscience*, **26**, 1011-1025.

Cruz G., Riquelme R., Espinosa P., et al. (2014) Neonatal exposure to estradiol valerate increases dopamine content in nigrostriatal pathway during adulthood in the rat. *Horm Metab Res*, **46**, 322-327.

Dahlstrom A. (1968) Effect of colchicine on transport of amine storage granules in sympathetic nerves of rat. *Eur J Pharmacol*, **5**, 111-113.

De Vries G. and Sodersten P. (2009) Sex differences in the brain: the relation between structure and function. *Horm Behav*, **55**, 589-596.

De Vries G.J., Al-Shamma, H.A. (1990) Sex differences in hormonal responses of vasopressin pathways in the rat brain. *J Neurobiol*, **21**, 686-693.

De Vries G.J., Buijs R.M. and Sluiter A.A. (1984) Gonadal hormone actions on the morphology of the vasopressinergic innervation of the adult brain. *Brain Res*, **298**, 141-145.

- De Vries, G. J. (2008) Sex differences in vasopressin and oxytocin innervation of the brain. *Prog Brain Res*, **170**, 17-27.
- De Vries, G. J., Best, W. and Sluiter, A. A. (1983) The influence of androgens on the development of a sex difference in the vasopressinergic innervation of the rat lateral septum. *Brain Res*, **284**, 377-380.
- Di Paolo T., Falardeau P., Morissette M. (1988) Striatal D-2 dopamine agonist binding sites fluctuate during the rat estrous cycle. *Life Sci*, **43**, 665-672.
- Díaz-Véliz G., Baeza, R., Benavente F., et al. (1994) Influence of the estrous cycle and estradiol on the behavioral effects of amphetamine and apomorphine in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **49**, 819-825.
- Evans A.C., Rcihter T.A., Skinner D.C., Robinson J.E.(2002) Neuroendocrine mechanisms underlying the effects of progesterone on the oestradiol-induced GnRH/LH surge. *Reprod Suppl*, **59**, 57-66.
- Fernández-Ruiz J.J., De Miguel R., Hernández M.L., Ramos J.A. (1990) Time-course of the effects of ovarian steroids on the activity of limbic and striatal dopaminergic neurons in female rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*, **36**, 603-606.
- Fuentealba J.A.(2010) Modelos animales para el estudio de la adicción a drogas de abuso. In: Bases científicas de la drogadicción. *Ed U. Católica de Chile*, 55-64.
- Guyton, A. C. and Hall, J. E. (2011) Tratado de fisiología médica. Elsevier España, S.L., Barcelona, España.
- Gysling, K. and Wang, R. Y. (1983) Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Res*, **277**, 119-127.
- Herrera, A., Casanova, J., Gatica, R., Escobar, F., Fuentealba, J. (2013) Clozapine pre-treatment has a protracted hypolocomotor effect on the induction and expression of amphetamine sensitization. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **47**, 1-6.
- Jakab, R. L. and Leranath, C. (1990) Catecholaminergic, GABAergic, and hippocamposeptal innervation of GABAergic "somatospiny" neurons in the rat lateral septal area. *J Comp Neurol*, **302**, 305-321.
- Johnson, S. W., Seutin, V. and North, R. A. (1992) Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump. *Science*, **258**, 665-667.
- Kalivas P.W. and Volkow N.D.(2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry*, **162**, 1403-1413.

- Koob G.F and Volkow ND. (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharm.***35**, 217-238.
- Koob, G. F. and Le Moal, M. (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, **278**, 52-58.
- Kosten T.R.(1993) Clinical and research perspectives on cocaine abuse: the pharmacotherapy of cocaine abuse. *NIDA Res Monogr*, **135**, 48-56.
- Kovacs,G. and Versteeg, D. (1993) Neurohypophysial Peptides and Brain Neurochemistry. *Annals of the New York Academy of Sciences* , **689**, 309–319.
- Marcondes F.K., Bianchi F.J., Tanno A.P. (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*, **62**, 609-614.
- Mathews I.Z. and 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, *Behav Pharmacol*, **18**,641-650.
- Mathews I.Z., Mills R.G., McCormick C.M. (2008) Chronic social stress in adolescence influenced both amphetamine conditioned place preference and locomotor sensitization. *Dev Psychobiol*, **50**, 451-459.
- McCormick C.M., Robarts D., Kopeikina K., Kelsey J.E. (2005) Long-lasting, sex- and age-specific effects of social stressors on corticosterone responses to restraint and on locomotor responses to psychostimulants in rats. *Horm Behav*, **48**, 64-74.
- Milesi-Hallé A., McMillan D., Laurenzana E. et al. (2007) Sex differences in (+)AMPH y (+)metanfetamina induced behavioral response in male y female sprague-dawley rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **86**, 140-149.
- Olds, J. and Milner, P. (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*, **47**, 419-427.
- OMS (2005) Neurociencia del consumo y dependencia de sustancias psicoactivas. Organización Mundial de la Salud, Washington D.C., USA.
- Ostrowski N.L., Lolait S.j., Bradley D.J., et al.(1992) Distribution of V1 and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. *Endocrinology*, **131**, 533-535.
- Paul, M. J., Terranova, J. I., Probst, C. K., Murray, E. K., Ismail, N. I. and de Vries, G. J. (2014) Sexually dimorphic role for vasopressin in the development of social play. *Front Behav Neurosci*, **8**, 58.

- Paulson, P.E., Camp D.M. and Robinson T.E. (1991) Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology*, **103**, 480-492.
- Paxinos, G. and Watson, C. (2009) The rat brain in stereotaxic coordinates. Compact sixth edition. Academic Press.
- Pfaus J.G., Damsma G., Nomikos G.G., et al. (1990) Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Res*, **530**, 345-348.
- Pierce, R. and Kalivas, P. (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res*, **25**, 192-216.
- Raggenbass, M. (2008) Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur J Pharmacol*, **583**, 243-254.
- Renard, G. M., Sotomayor-Zarate, R., Blanco, E. H. and Gysling, K. (2014) Withdrawal from chronic amphetamine reduces dopamine transmission in the rat lateral septum. *J Neurosci Res*. **92**, 937-943.
- Risold, P. and Swanson, L. (1997) Connections of the rat lateral septal complex. *Brain research Rev*, **24**, 115-195.
- Sartor G. and Aston-Jones G. (2012) Regulation of the ventral tegmental area by the bed nucleus of the stria terminalis is required for expression of cocaine preference. *Eur J Neuroscience*, **36**, 3549–3558.
- Scholl J.L., Feng N., Watt M.J. et al. (2009) Individual differences in amphetamine sensitization, behavior and central monoamines. *Physiol Behav*, **96**, 493-504.
- Segarra A.C., Agosto-Rivera J.L., Febo M., et al. (2010) Estradiol: a key biological substrate mediating the response to cocaine in female rats. *Horm Behav*, **58**, 33-43.
- SENDA (2013) Décimo Estudio Nacional de Drogas en Población General. Gobierno de Chile, Santiago, Chile.
- Sheehan, T. P., Chambers, R. A. and Russell, D. S. (2004) Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Res Rev*, **46**, 71-117.
- Silverman J.L. and Koenig J.I.(2007) Evidence for the involvement of ERbeta and RGS9-2 in 17-beta estradiol enhancement of amphetamine-induced place preference behavior. *Horm Behav*, **52**,146-155

Sotomayor, R., Forray, M. I. and Gysling, K. (2005) Acute morphine administration increases extracellular DA levels in the rat lateral septum by decreasing the GABAergic inhibitory tone in the ventral tegmental area. *J Neurosci Res*, **81**, 132-139.

Sotomayor-Zarate, R., Araya, K. A., Pereira, P. et al. (2010) Activation of GABA-B receptors induced by systemic amphetamine abolishes dopamine release in the rat lateral septum. *J Neurochem*, **114**, 1678-1686.

Sotomayor-Zarate, R., Renard, G. M., Araya, K. A., et al.(2013) Long-term loss of dopamine release mediated by CRF-1 receptors in the rat lateral septum after repeated cocaine administration. *Behav Brain Res*, **250**, 206-210.

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 Tissue Res*, **264**, 391-413.

Steketee J.D. and Kalivas P.W. (2011) Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol rev*, **63**, 348-365.

Sulzer, D., Sonders, M. S., Poulsen, N. W. and Galli, A. (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol*, **75**, 406-433.

Szot P. and Dorsa D.M.(1994) Expression of cytoplasmic and nuclear vasopressin RNA following castration and testosterone replacement: Evidence for transcriptional regulation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **5**, 1-10.

Tzschentke, T., (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol*, **56**, 613-72.

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

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

Walker Q.D., Nelson C.J., Smith D. Kuhn C.M. (2002) Vaginal lavage attenuates cocaine-stimulated activity and establishes place preference in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **73**, 743-752.

Wang Z. and De Vries G. (1995) Androgen and estrogen effects on vasopressin messenger RNA expression in the medial amygdaloid nucleus in male and female rats. *J Neuroendocrinol*, **7**, 827-831.

Wang Z., Zhou L. et al. (1996) Immunoreactivity of central vasopressin and oxytocin pathways in microtine rodents: A quantitative comparative study. *Journal of Comparative Neurology*, **366**, 726-737.

Wang, Z., Bullock N. and De Vries G. (1993) Sexual differentiation of vasopressin projections of the bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdaloid nucleus in rats. *Endocrinol*, **132**, 2299-2306.

Wise R.A. (2002) Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron*, **36**, 229-240

Wu L.T., Schlenger W.E. (2003) Psychostimulant dependence in a community sample. *Subst Use Misuse*, **38**, 221-248.

Zhou Y., Bendor J.T., Yuferov V., et al. (2005) Amygdalar vasopressin mRNA increases in acute withdrawal: evidence for opioid receptor modulation. *Neuroscience*, **134**, 1391-1397.