



UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA DE CONDUCTAS SOCIALES Y
ADICTIVAS
CIBAP
ESCUELA DE MEDICINA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
USACH

EFFECTO DE LA PERFUSIÓN INTRASEPTAL DE VASOPRESINA SOBRE
LA LIBERACION DE GABA EN SEPTUM LATERAL Y DE DOPAMINA Y
GABA EN AREA TEGMENTAL VENTRAL DE RATAS MACHO

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

FRANCISCA PILAR TOBAR MARAMBIO

Director de Tesis: Dra. Georgina Renard

2018

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación con el que culmina mi etapa universitaria, ha significado un período intenso, de sacrificio y mucho aprendizaje. Ha sido una experiencia enriquecedora y desafiante, tanto a nivel personal como a nivel de formación profesional. Gracias a mi estimada directora de tesis, Dra. Georgina Renard, por darme la bienvenida en su equipo de investigación. Gracias por su infinita paciencia y motivación, por su excelente disposición, y por guiarme con su sabiduría y gentileza. A mis queridas compañeras de laboratorio porque pude contar con ellas siempre que lo necesité, gracias por su apoyo, compañerismo y por lo grato que fue compartir con ustedes.

Gracias al Dr. Ramón Sotomayor y a su equipo por haberme recibido cálidamente en su laboratorio cada vez que precisé su colaboración.

Agradezco a mis queridos compañeros y amigos que me acompañaron durante esta carrera, me incentivaron y de quienes aprendí muchísimo además, gracias por su apoyo y cariño.

Finalmente agradezco a toda mi familia, a mi madrina por su apoyo incondicional y principalmente a mis padres por haberme otorgado el privilegio de estudiar en esta escuela y ampliar mis horizontes.

RESUMEN

La arginina-vasopresina (AVP) es un neuropéptido bastante estudiado respecto a conductas como; parental y socio-sexual, sin embargo, no se conoce mucho acerca de su relación con la conducta adictiva y comportamientos asociados a la recompensa. Se ha demostrado que la AVP tiene el potencial de modular directa e indirectamente los niveles extracelulares de algunos neurotransmisores en varias regiones cerebrales; como la corteza prefrontal, la amígdala, el Septum y el cuerpo estriado. El Septum Lateral (SL) juega un rol crítico en la regulación de procesos asociados al estado de ánimo y la motivación. Este núcleo está íntimamente relacionado con el circuito de la recompensa y posee proyecciones GABAérgicas que modulan la liberación de Dopamina (DA) en el Área Tegmental Ventral (VTA). En nuestro laboratorio, hemos visto que la administración de AVP en SL reduce la conducta tipo adictiva. En este contexto, considerando que el SL expresa una alta densidad de receptores V_{1A} de vasopresina, nos preguntamos cómo la administración intra-SL de AVP podría estar modulando la neurotransmisión en el SL y en el VTA. En este estudio se realizó microdiálisis *in vivo* en ratas macho Sprague Dawley, usando dos sondas: una en el SL para la perfusión de AVP (1 μ g/mL) y medición de los niveles extracelulares de GABA, la otra en el VTA para la medición de los niveles extracelulares de GABA y DA durante la infusión intra-SL de AVP. La cuantificación de DA se llevó a cabo mediante HPLC acoplado a detector electroquímico y la de GABA y Glutamato mediante HPLC acoplado a detector fluorométrico. Nuestros resultados muestran que durante la perfusión intra-SL de AVP, se genera un incremento en los niveles extracelulares de GABA en el SL,

mientras que en el VTA, se observó una disminución en los niveles de DA. Estos resultados sugieren que la infusión intra-SL de AVP estaría inhibiendo las neuronas GABAérgicas del SL que proyectan al VTA. La activación de los receptores V_{1A} en el SL podría ser un blanco farmacológico para reducir conductas de tipo adictivo.

ABSTRACT

Effect of intraseptal vasopressin perfusion on the release of GABA in lateral septum and dopamine and GABA in ventral tegmental area of male rats

Arginine-vasopressin (AVP) is a neuropeptide well known for its relation with paternal and social-sexual behavior, but its influence on addiction and reward related behaviors has been scarcely studied. Interestingly, it has been shown that AVP has potential to modulate directly and indirectly extracellular levels of neurotransmitters in several brain nuclei. The lateral septum (LS) plays a critical role in modulating mood and motivation and it is related with the reward system. LS projects GABAergic neurons to the ventral tegmental area (VTA) regulating dopamine (DA) release. Our lab has shown that AVP administration in LS reduce addictive like behaviors. In this context and considering that LS expressed V_{1A} receptor, we wonder how intra-LS AVP administration could modulate neurotransmission in the LS and VTA. We performed in vivo microdialysis experiments in male Sprague Dawley rats using two probes: One in the LS to perfuse AVP (1 $\mu\text{g/ml}$) and measure GABA extracellular levels and the other one in VTA to measure GABA and DA extracellular levels after an AVP intra-LS infusion. GABA and DA were measure with HPLC coupled to fluorescent and electrochemical detection, respectively. Our results showed an increase in GABA extracellular levels in LS after intra-LS AVP infusion, while in the same experiment was observed a decrease in DA extracellular levels in VTA. This results suggest that intra-LS AVP infusion produce an increase in GABA release from LS-interneurons inhibiting GABA projections to VTA. The activation of V_{1A} receptor in LS could be a pharmacological target to reduce addictive-like behaviors.

ÍNDICE

i.- INTRODUCCIÓN	1
1.1. Vasopresina en el sistema nervioso central	1
1.2. Vasopresina y septum lateral	3
1.3. Septum lateral y el circuito de la recompensa	4
ii.- HIPÓTESIS:	8
iii.- OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo general:.....	9
3.2. Objetivos específicos:.....	9
iv.- MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. Diseño Experimental.....	10
4.2. Animales:	11
4.3. Reactivos:	11
4.4 Microdiálisis in vivo en animales anestesiados:.....	11
4.5. Protocolo de recolección de muestra:.....	13
4.6. Confirmación posturas de sondas de microdiálisis	13
4.7. Determinación cuantitativa de DA:.....	14
4.8. Determinación cuantitativa de GABA y Glutamato:	15
4.9. Análisis estadístico:	16
v.- RESULTADOS	17
5.1. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre los niveles extracelulares de GABA en SL	17
5.2. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre los niveles extracelulares de glutamato en SL	18

5.3. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre los niveles extracelulares de DA en el VTA.....	19
5.4. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre los niveles extracelulares de GABA en el VTA.....	20
5.5. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre los niveles extracelulares de glutamato en el VTA	21
vi.- DISCUSIÓN.....	22
6.1. Efecto de la perfusión AVP intra-SL sobre los niveles de GABA en SL y GABA y DA en VTA.....	22
6.2. Liberación de GABA y glutamato en el SL por perfusión intra-SL AVP	22
6.3. Liberación de DA, GABA y glutamato en el VTA por perfusión intra-SL de AVP	24
vii.- CONCLUSIONES.....	28
viii.- BIBLIOGRAFÍA.....	29
ix.- ABREVIATURAS	33

i.- INTRODUCCIÓN

1.1. Vasopresina en el sistema nervioso central

La vasopresina (AVP) es un neuropéptido formado por nueve aminoácidos (Figura 1) y sintetizado principalmente en el núcleo paraventricular y núcleo supraóptico del hipotálamo participando en la regulación de la presión sanguínea, homeostasis osmótica y respuesta de estrés (Caldwell et al, 2008). Otros núcleos que sintetizan AVP incluyen la amígdala medial (MeA) y el lecho de la estría terminal (BNST), los cuales proyectan a numerosos núcleos del cerebro regulando conductas como agresión, afiliación, preferencia social e interacción social (Lukas et al, 2015).

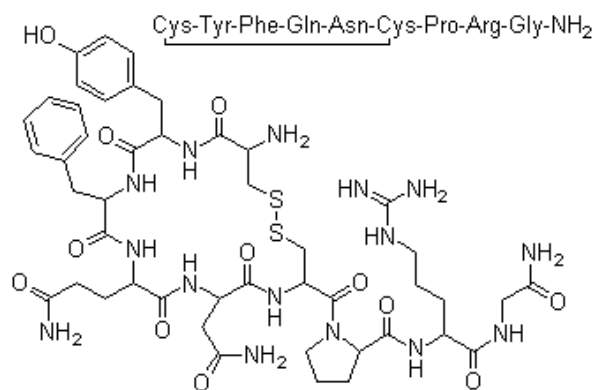
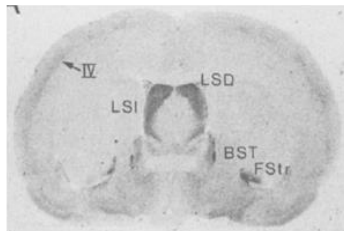


Figura 1. Estructura molecular de (arg8)-vasopresina. (NH₂-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-COOH PM: 1084.23 g/mol).

La AVP actúa mediante la activación de tres receptores acoplados a proteína G, los receptores V_{1A}, V_{1B} y V₂ (Stoop et al, 2012). Los receptores V₂ se encuentran principalmente en el riñón, mientras que los receptores V₁ se expresan en la periferia y están ampliamente expresados en el cerebro. Los receptores V_{1B} se encuentran principalmente en las células adrenocorticotropas (ACTH) positivas

de la hipófisis anterior, pero también han sido descritos en otros núcleos como hipotálamo, amígdala y cerebelo (Hernando et al, 2001). Estudios han demostrado la presencia de receptores V_{1A} en el sistema olfatorio, neocórtex, ganglios basales, BNST, hipotálamo ventromedial, septum lateral (SL), tálamo, tronco encefálico y médula espinal (Figura 2A) (Yu et al, 1996). El receptor V_{1A} es un receptor acoplado a proteína G_q (Stoop et al, 2012), el cuál juega un rol prominente en la modulación vasopresinérgica de conductas sociales, por lo que ha sido el foco de la mayoría de los estudios que han examinado el rol de la AVP en la regulación del comportamiento social (Donaldson et al, 2008). Su rol en procesos adictivos ha sido poco estudiado, sin embargo, varios estudios muestran la participación de este neuropéptido en conductas adictivas (Godino y Renard, 2018). Se ha observado que AVP es capaz de modular la liberación de neurotransmisores. Se observó que AVP produce un incremento en la liberación y recaptura de dopamina (DA) en diferentes áreas del cerebro, como la amígdala, corteza prefrontal, septum y cuerpo estriado (Caldwell et al, 2008).

2.A.



2.B.

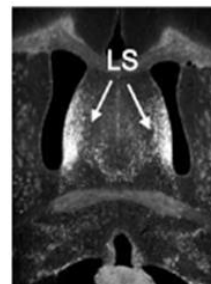


Figura 2. (2.A.) Altos niveles de sitio de unión al receptor acoplado a V_{1A} acoplado a proteína G_q en LSI, LSD (SL), BNST (extraído de Johnson et al, 1993). (2.B.) Fibras vasopresinérgicas provenientes de BNST y amígdala medial proyectan al SL. (extraído de Sheenan et al, 2004).

1.2. Vasopresina y septum lateral

El SL es un núcleo de relevo de información GABAérgico que se encuentra bajo la influencia de un tono basal inhibitorio proveniente del septum medial y de las propias interneuronas GABAérgicas del SL (Risold et al, 1995). Los receptores V_{1A} son abundantes en el SL (Ostrowski et al, 1992) y además, este núcleo es innervado por una alta densidad de proyecciones vasopresinérgicas originadas en el BNST y la MeA (De Vries et al, 1984) (Caffe et al, 1987) (Figura 2B). Según estudios electrofisiológicos, la AVP excita aproximadamente un 40 % de las neuronas en el SL mediante la activación de receptores V_{1A} . Luego de esta excitación se observa una posterior inhibición de neuronas GABAérgicas en este núcleo (Raggenbas et al, 2008), planteando la posibilidad de que la AVP excitaría a las interneuronas del SL con una posterior inhibición de las neuronas de proyección.

Se ha demostrado que AVP en el SL aumenta las conductas sociales (Luka et al, 2011), que es un recompensante natural. Buscando posibles factores que sean responsables de la vulnerabilidad existente al abuso de drogas, se ha estudiado la relación de distintos neuropéptidos y las drogas de abuso. Además, una de las consecuencias más problemáticas del abuso de sustancias, es la alteración de diferentes comportamientos sociales, los cuales se ven regulados de forma importante por la AVP (De Vries et al, 1984). En nuestro laboratorio se ha observado que una dosis aguda de amfetamina (AMPH) (Ahumada et al, 2017) y el condicionamiento a AMPH durante 4 días (Renard, comunicación personal) produce una disminución de los niveles de AVP en el SL de ratas macho, sin

afectar a ratas hembras. Además, se observó que la administración de AVP intra-SL luego del condicionamiento, reduce la expresión de la conducta de condicionamiento a AMPH (prueba que evalúa el efecto recompensante de las drogas de abuso) (Tzschentke et al, 1998) en ratas macho (Renard, comunicación personal).

1.3. Septum lateral y el circuito de la recompensa

El circuito de recompensa o circuito mesocorticolímbico, es un circuito neuroanatómico presente en el cerebro de vertebrados, que se activa por recompensantes naturales como la comida, la ingesta de líquidos, el sexo y la interacción social. A nivel neurobiológico uno de los núcleos dopaminérgicos más importantes en el sistema de recompensa, es el área tegmental ventral (VTA) (Assaf et al, 1997), el cual tiene interneuronas GABAérgicas, que, en condiciones basales, mantienen un tono inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgica que se encuentran en este núcleo (Johnson et al, 1992). Estas neuronas dopaminérgicas proyectan hacia el núcleo accumbens (NAcc), corteza prefrontal (Koob et al, 2010) y otras áreas límbicas como el SL (Risold et al, 1995).

Se ha demostrado que distintas sustancias adictivas como psicoestimulantes (anfetaminas, cocaína), opiáceos, alcohol, cannabis, entre otros producen un aumento de la liberación de DA a nivel del NAcc, provocando un efecto recompensante (Di Chiara e Imperato, 1988). La drogadicción es un trastorno crónico (reincidente) que ha sido caracterizado por la búsqueda y el consumo compulsivos de la droga, la pérdida de control en la limitación de la ingesta de la droga y la aparición de estados emocionales negativos tales como

disforia, irritabilidad y ansiedad, los cuales se exacerban durante la abstinencia. En 1997 Koob y Le Moal atribuyeron las conductas anteriormente mencionadas a la desregulación del circuito de recompensa (Koob y Le Moal, 1997).

Uno de los núcleos involucrados en el circuito de la recompensa es el SL. Los primeros estudios que revelaron una participación del SL en procesos relacionados a la recompensa fueron los trabajos de Olds y Milner en los años 50. Ellos demostraron que los animales experimentaban recompensa cuando se autoestimulaban el SL (Olds y Milner, 1954). Además, en los últimos años, ha habido un número creciente de trabajos que demuestran la participación del SL en los efectos recompensantes de las drogas de abuso. Se ha demostrado que una inhibición farmacológica del SL mediante agonistas de los receptores GABA_A Y GABA_B, muscimol y baclofeno respectivamente, inhibe la expresión de preferencia por cocaína en la prueba de preferencia de lugar condicionado (Sartor et al, 2012) e inhibe la recaída a la búsqueda de cocaína inducida por contexto (Luo et al, 2011). El trabajo de Luo y colaboradores (2011) demostró que la activación de las células piramidales glutamatérgicas del área CA3 del hipocampo dorsal excita las neuronas GABAérgicas en el SL, las cuales proyectan sobre las interneuronas GABAérgicas del VTA (Figura 3).

Model of CA3— cd-LS — VTA circuit

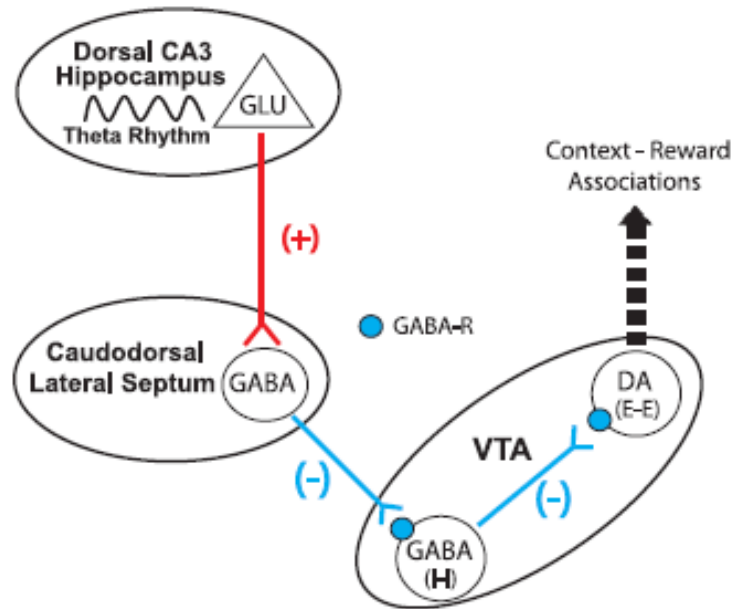


Figura 3. La activación de las células piramidales glutamatérgicas área CA3 del hipocampo dorsal excita las neuronas GABAérgicas del cd-LS que proyectan hacia las interneuronas GABA inhibitorias del VTA (I-I). La liberación de GABA desde las neuronas del cd-LS actúa sobre los receptores gabaérgicos para inhibir las interneuronas GABA locales en VTA que proyectan hacia las neuronas dopaminérgicas del VTA. Las neuronas Dopaminérgicas excitatorias (E-E), no encontrándose ya bajo un tono inhibitorio, muestra una robusta activación via desinhibición. La influencia de la vía CA3–cd-LS–VTA (cd-LS: Septum Lateral-caudodorsal) en conjunto con otras regiones del cerebro, regulan comportamientos que dependen de las asociaciones, tal como la búsqueda de cocaína reinstalada por contexto. (Luo et al, 2011).

La liberación de GABA desde el SL inhibiría las neuronas GABAérgicas locales en el VTA provocando un aumento de la activación de las neuronas dopaminérgicas de este núcleo. Por otro lado, se ha visto que la administración sistémica de AMPH aumenta la actividad de las neuronas del SL que proyectan hacia el VTA, por lo que el SL podría estar modulando conductas tipo adictivas inducidas por AMPH (Colussi-Mas et al, 2007).

Teniendo en cuenta los antecedentes y los resultados observados en el laboratorio surge la pregunta: *¿Cómo modula la AVP desde el SL en ratas macho la expresión de la conducta de condicionamiento a AMPH?* Como mencionamos anteriormente, las proyecciones GABAérgicas desde el SL hacia las interneuronas GABA del VTA podrían participar en la modulación de las neuronas dopaminérgicas y así afectar la conducta de condicionamiento a AMPH. Si bien es conocido que el SL expresa una gran cantidad de receptores V_{1A} , no se conoce la ubicación de los mismos tanto a nivel presináptico como postsináptico. Según todo lo expuesto anteriormente planteamos que la AVP en el SL produciría un aumento en la liberación de GABA en este núcleo, inhibiendo sus proyecciones y aumentando por tanto la actividad GABAérgica de las interneuronas en el VTA de ratas macho. En consecuencia, habría una disminución de la actividad dopaminérgica en el VTA.

ii.- HIPÓTESIS:

La perfusión de AVP en el SL produce un aumento en la liberación de GABA en SL y VTA y a su vez una disminución de la liberación de DA en VTA de ratas macho.

iii.- OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

Estudiar los efectos de la administración de AVP intra-SL por microdiálisis reversa sobre los niveles de GABA en el SL y el VTA y DA en el VTA en ratas macho.

3.2. Objetivos específicos:

- 1.- Estudiar los efectos de la administración de AVP por microdiálisis reversa en el SL sobre la liberación de GABA en este núcleo en ratas macho.

- 2.- Estudiar los efectos de la administración de AVP por microdiálisis reversa en el SL sobre la liberación de GABA y DA en el VTA de ratas macho.

iv.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño Experimental

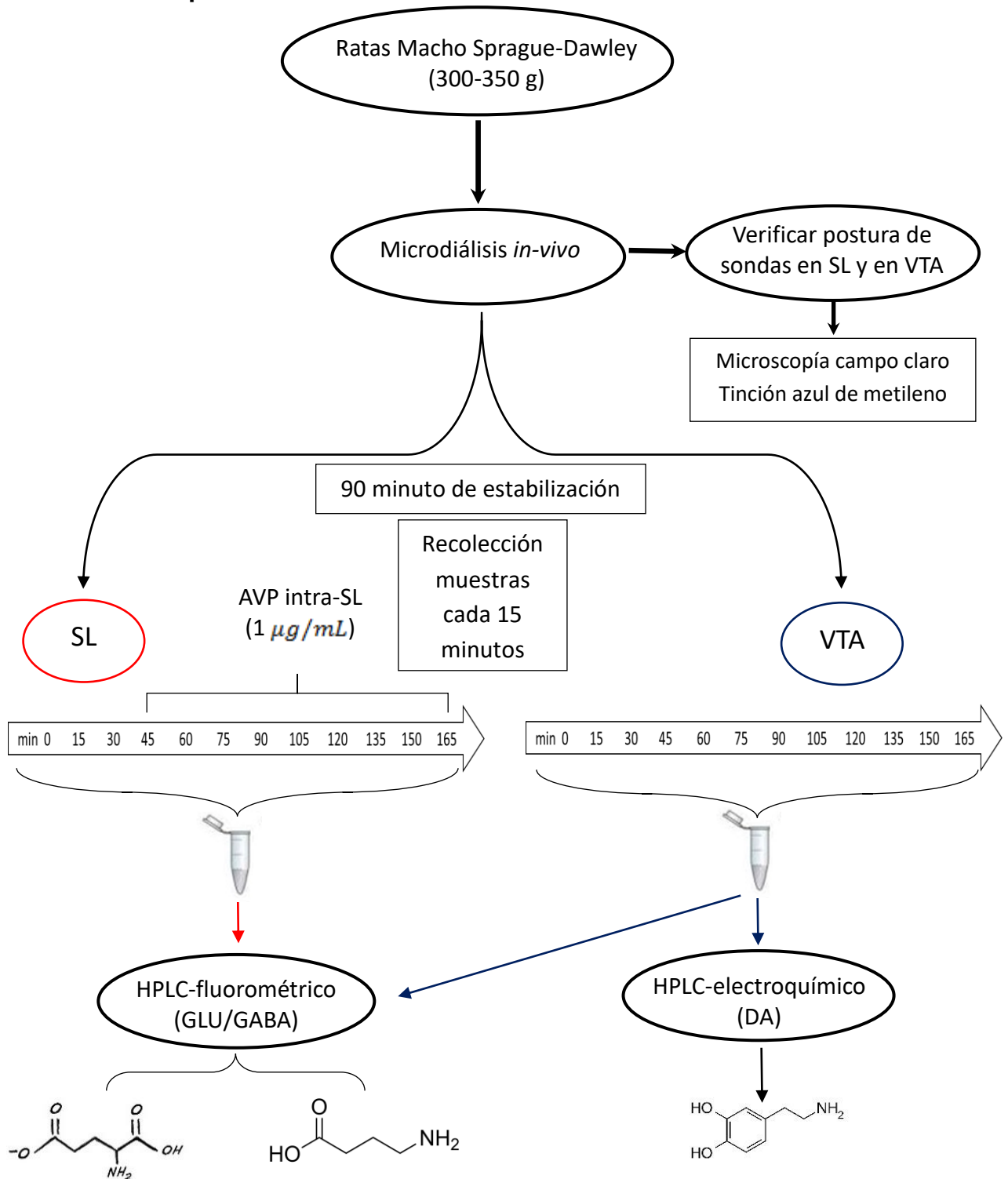


Figura 4. Esquema de procedimiento experimental.

4.2. Animales:

Se utilizaron 11 ratas Sprague Dawley machos de 60 a 65 días de vida (300-350 g), sin embargo, debido a la complejidad del experimento, sólo en 5 de ellas se logró posicionar las sondas en ambos núcleos. Los animales se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Luego, se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas: con ciclos de 12 horas luz/oscuridad a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, agua y comida *ad libitum*, en la sala de mantención de animales del Centro de Investigación Biomédica y Aplicada de la Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago de Chile. Todos los protocolos experimentales bioéticos y de bioseguridad fueron aprobados para el Proyecto FONDECYT N° 11140065.

4.3. Reactivos:

La AVP (arg8)-vasopresina (AVP) ($\text{NH}_2\text{-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-COOH}$ PM: 1084.23 g/mol) fue sintetizada por la Dra. Funny Guzman de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Los estándares de glutamato, GABA y dopamina fueron adquiridos de Sigma Aldrich Chile S.A. Los reactivos utilizados en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fueron de grado analítico.

4.4 Microdiálisis *in vivo* en animales anestesiados:

Para estudiar los niveles extracelulares de GABA en SL y los niveles de GABA y DA en VTA se realizaron microdiálisis *in vivo* en ratas anestesiadas. La microdiálisis cerebral se basa en la difusión de compuestos de bajo peso molecular a favor del gradiente de concentración, entre el líquido extracelular

cerebral, y fluido estéril cerebroespinal artificial (aCSF) que fluye a velocidad constante por la sonda de microdiálisis.

Luego de anestésiar a los animales con uretano (1.5 g/kg) y comprobar la pérdida de los reflejos del animal, estos fueron montados en un aparato estereotáxico (Model 68002, RWD LifeScience Co. Ltd, China). Durante todo el procedimiento la temperatura de los animales se mantuvo a 37°C con una manta eléctrica controlada por un termostato. El cráneo de los animales fue expuesto a través de una incisión en la piel y se procedió a perforar dos agujeros pequeños. Uno de ellos fue a la altura del SL y el otro a la altura del VTA. En cada uno de los agujeros se implantó una sonda de microdiálisis de 2 mm, una en el SL derecho según las siguientes coordenadas: SL: 0.2 mm anterior, 0.8 mm lateral y 5.8 mm ventral desde Bregma y de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2009) y en el VTA derecho según las siguientes coordenadas: 5.2 mm posterior, 0.5 mm lateral y 8 mm ventral de Bregma, obtenidas de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2009).

Las sondas fueron perfundidas constantemente con aCSF cuya composición es (mM: 2.5 KCl, 125 NaCl, 1.18 MgCl₂, 1.26 CaCl₂) a un flujo de 2 µL/min mediante una bomba de perfusión RWD (modelo 210 RWD, RWD LifeScience Co. Ltd, China).

4.5. Protocolo de recolección de muestra:

Luego de un período de estabilización de 90 min, se recolectaron las muestras de dializado en 4 μ L de ácido perclórico 0.2 N cada 15 minutos y según el siguiente protocolo experimental:

Al finalizar el período de estabilización se recolectaron 3 muestras basales (bajo perfusión sólo de aCSF) entre los 0 y 45 minutos del período de recolección.

Al finalizar la recolección de la tercera muestra basal, se perfundió AVP en aCSF (1 μ g/mL, según Bosch y Neumann 2010), por microdiálisis reversa en el SL y se recolectaron 8 muestras del SL y del VTA cada 15 minutos: a los 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 y 165 minutos.

Las muestras se recibieron en hielo y se almacenaron a -20°C para la posterior determinación de GABA por HPLC acoplado a detector fluorométrico y para la detección de DA por HPLC acoplado a detector electroquímico.

4.6. Confirmación posturas de sondas de microdiálisis

Al finalizar cada experimento, las ratas fueron decapitadas, se les extrajo el cerebro y se colocaron en paraformaldehído 4% durante 7 días y posterior a aquello permanecieron en solución de sacarosa durante 3 días para crioproteger el tejido. Se cortaron secciones de 50 μ m del cerebro en un criostato (modelo CM 1510-1, Leica), luego los cortes se tiñeron con azul de metileno y se montaron en portaobjetos para posterior observación al microscopio. En las Figuras 5.A y 5.B se observan las posturas representativas de las posturas de sonda de microdiálisis en el SL y en el VTA, respectivamente.

5.A.



5.B.

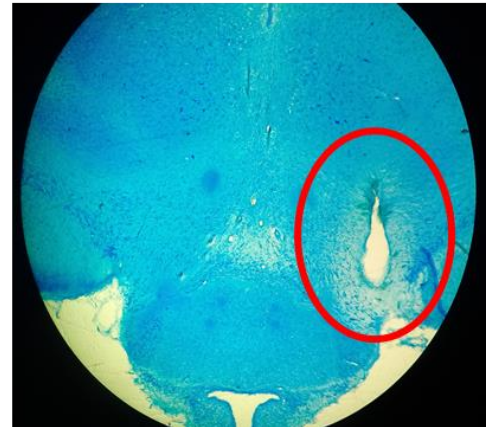


Figura 5. Posturas de sonda de microdiálisis. Fotografías: Cortes frontales de cerebro de rata macho. Marcas de las sondas en SL derecho (5.A) y VTA derecho (5.B) observado en microscopio objetivo 4x. Técnica: Tinción con azul de metileno.

4.7. Determinación cuantitativa de DA:

Usando una jeringa Hamilton, se inyectaron 10 μ L del dializado en un sistema de HPLC con la siguiente configuración: bomba isocrática (model PU-2080 Plus, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan), una columna UniJetmicrobore (MF-8912, BAS, West Lafayette, IN, USA) y un detector electroquímico (set at 650 mV, 0.5 nA; model LC-4C, BAS, West Lafayette, IN, USA).

La composición de la fase móvil correspondió a NaH₂PO₄ 0.05 M, ácido 1-octanosulfónico 1.0 mM, EDTA 0.27 mM y 4.0% (v/v) CH₃CN (pH ajustado a 2.5) bombeada a un flujo 80 μ L/min. El tiempo de retención para DA fue de 10,3 minutos y las áreas de los picos se compararon con estándares de referencia para calcular las concentraciones de DA usando una curva de calibrado realizada con el programa cromatográfico (ProgramChromPass, Jasco Co.Ltd.,Tokyo, Japan).

4.8. Determinación cuantitativa de GABA y Glutamato:

La determinación cuantitativa de GABA y Glutamato se realizó mediante una derivatización precolumna y posterior inyección de la muestra en un HPLC acoplado a detector fluorométrico. Los filtros se configuraron para una longitud de onda excitatoria de 350 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. Se mezclaron 20 μ L del dializado (muestra) con 4 μ L de buffer borato (pH 10.8) y se derivatizó por adición de 4 μ L de reactivo fluorogénico (20 mg de ortoftaldehído y 10 μ L de b-mercaptoetanol en 5 mL de etanol). 90 segundos luego de la derivatización, se inyectaron las muestras en el sistema HPLC con la siguiente configuración: bomba isocrática (model PU-4180, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan), una columna de fase reversa C-18 (Kromasil 3-4.6; Suecia), y un detector fluorométrico (modelo FP-4025, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan). Se usó un gradiente isocrático.

La composición de la fase móvil correspondió a: 0.1 M de NaH_2PO_4 y 24% CH_3CN (pH 5.7), y fue bombeada a un flujo de 1 mL/min. Los tiempos de retención para Glutamato y GABA fueron de 2.9 y 16.0 minutos respectivamente. Las áreas de los picos se compararon con estándares de referencia y se calcularon las concentraciones de GABA y Glutamato usando una curva de calibrado realizada con el programa cromatográfico (ProgramChromNAV 2.0, Jasco Co.Ltd.,Tokyo, Japan).

4.9. Análisis estadístico:

Los resultados se presentan como porcentaje respecto a las concentraciones basales y se expresan como valor promedio \pm error estándar medio (EEM). Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por un post-test Newman-Keuls para determinar la diferencia significativa entre los porcentajes de niveles extracelulares estimulados por la perfusión de AVP respecto a los basales. La diferencia estadísticamente significativa se estableció cuando el valor de p fue menor a 0.05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa GraphPadPrism 7.0 (GraphPad, Software, San Diego, CA, USA).

v.- RESULTADOS

5.1. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre los niveles extracelulares de GABA en SL

La figura 6 representa la liberación de GABA en SL expresada como porcentaje respecto al basal. La perfusión intra-SL de AVP (barra negra), comenzó al min 45 y continuó durante el resto del experimento. A los minutos 75 y 105 se observa un aumento estadísticamente significativo del porcentaje de liberación de GABA respecto a la línea base (115% y un 100% respectivamente, $p < 0.05$). En el último punto, al minuto 165, (120 minutos de perfusión de AVP) se observa que el porcentaje de liberación de GABA vuelve a los niveles basales.

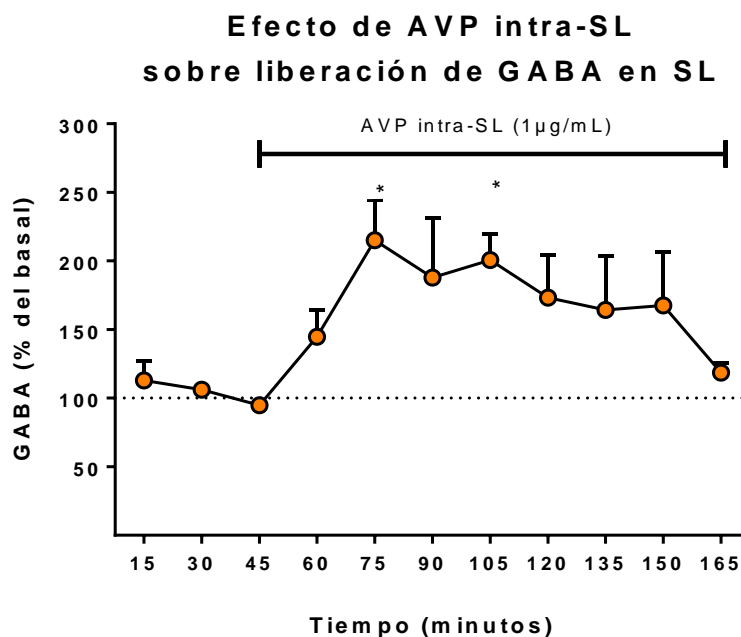


Figura 6. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre la liberación de GABA en SL. Liberación de GABA expresada como porcentaje del basal de muestras recolectadas cada 15 minutos. La barra en negra representa el período de tiempo durante el cual se realizó

la perfusión intra-SL de AVP. Los datos están representados como la media \pm EEM; $n=6$. (* $p < 0.05$ respecto de los basales).

5.2. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre los niveles extracelulares de glutamato en SL

En la figura 7 se observa el porcentaje de liberación de glutamato en el SL respecto al basal durante la perfusión intra-SL de AVP. Al comenzar la perfusión de AVP intra-SL, no se observan cambios en porcentaje de liberación de glutamato. Sin embargo, en el minuto 135 de la microdiálisis (a los 90 minutos de perfusión intra-SL de AVP) se observa un aumento de un 58% no estadísticamente significativo, que luego desciende en los últimos dos puntos, llegando cerca de la línea base.

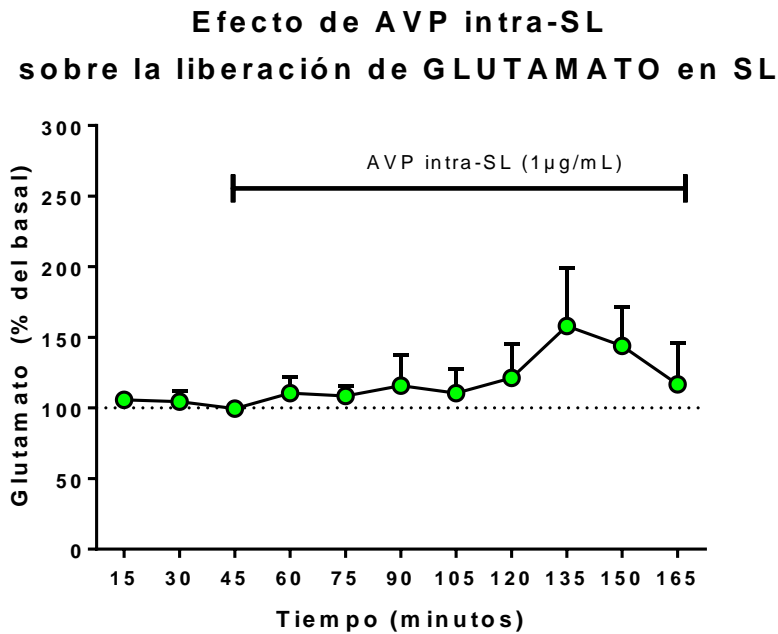


Figura 7. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre la liberación de glutamato en SL. Liberación de glutamato expresada como porcentaje del basal de muestras recolectadas cada 15 minutos. La barra en negra representa el tiempo durante el cual se perfundió AVP intra-SL. Los datos están representados como la media \pm EEM; $n=6$.

5.3. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre los niveles extracelulares de DA en el VTA

En la figura 8 se observa la liberación de DA en VTA expresada como porcentaje del basal, durante la perfusión intra-SL de AVP. En el minuto 60 de la microdiálisis (15 minutos luego del comienzo de la perfusión intra-SL de AVP) se observa una disminución de los niveles extracelulares de DA en un 63% respecto a la línea base, aunque no es estadísticamente significativo. Luego los niveles extracelulares de DA comienzan a aumentar gradualmente hasta volver a la línea base.

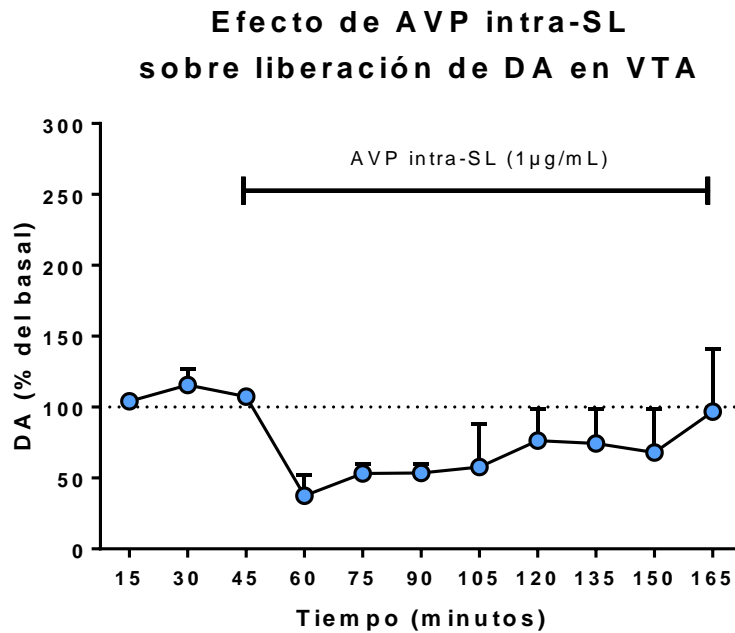


Figura 8. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre la liberación de DA en VTA. Liberación de DA expresada como porcentaje del basal en muestras recolectadas cada 15 minutos. La barra en negro representa el tiempo durante el cual se perfundió AVP intra-SL. Los datos están representados como la media \pm EEM; $n=3$.

5.4. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre los niveles extracelulares de GABA en el VTA

La figura 9 muestra la liberación de GABA en el VTA expresada como porcentaje respecto al basal. Se puede apreciar que los niveles de GABA se mantienen muy cercanos a la línea base. hasta el minuto 105 del experimento, en que (luego de 60 minutos de perfusión de AVP intra-SL) se observa un aumento no significativo.

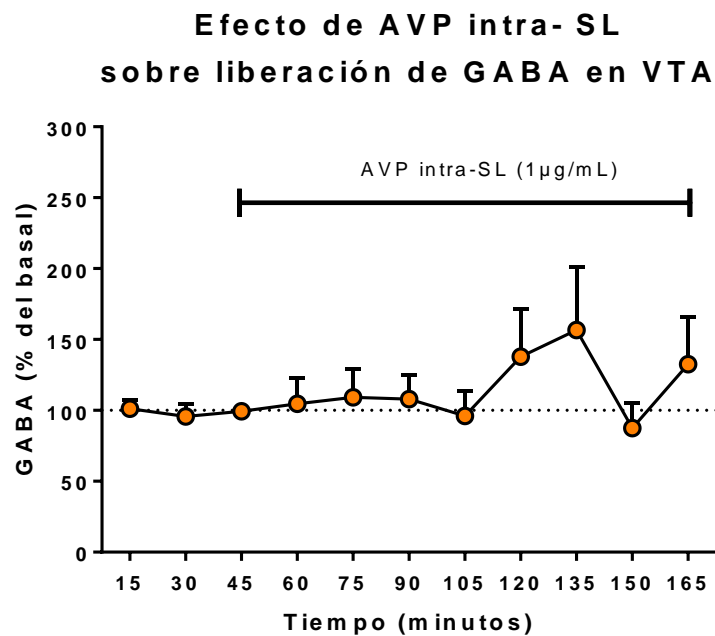


Figura 9. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre la liberación de GABA en VTA. Liberación de GABA expresada como porcentaje del basal en muestras recolectadas cada 15 minutos. La barra en negra representa el tiempo durante el cual se perfundió AVP en SL. Los datos están representados como la media \pm EEM; $n=4$.

5.5. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre los niveles extracelulares de glutamato en el VTA

En la figura 10 se muestra el porcentaje de liberación de glutamato en el VTA respecto al basal durante la perfusión intra-SL de AVP. No se obtienen cambios estadísticamente.

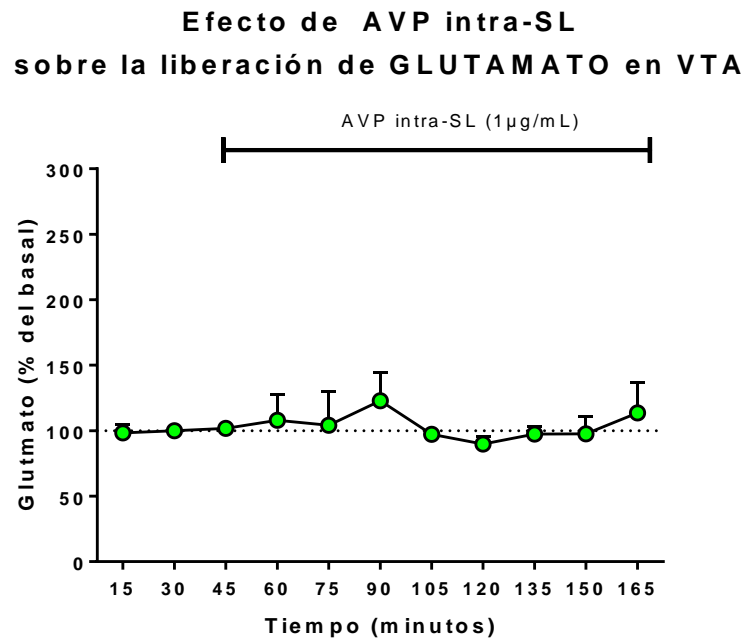


Figura 10. Efecto de la perfusión intra-SL de AVP sobre la liberación de glutamato en VTA. Liberación de glutamato expresada como porcentaje del basal en muestras recolectadas cada 15 minutos. La barra en negra representa el tiempo durante el cual se perfundió de AVP en SL. Los datos están representados como la media \pm EEM; $n=4$.

vi.- DISCUSIÓN

6.1. Efecto de la perfusión AVP intra-SL sobre los niveles de GABA en SL y GABA y DA en VTA

El SL es un núcleo principalmente GABAérgico (Risold y Swanson, 1997), y posee proyecciones hacia el VTA (Luo et al, 2011). Además, el SL recibe proyecciones vasopresinérgicas desde el BNST y la MeA y posee una alta densidad de receptores V_{1A} (Ostrowski, 1992). Nuestros resultados muestran un aumento en la liberación de GABA en el SL tras la perfusión intra-SL de AVP. El VTA, que es parte del circuito de la recompensa (Assaf et al, 1997), contiene interneuronas GABAérgica que mantienen un tono inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgica de este núcleo (Johnson et al, 1992). Luo y colaboradores (2011) demostraron que las proyecciones GABAérgicas desde el SL regularían la actividad de las interneuronas del VTA. Los resultados obtenidos en el VTA muestran una disminución de los niveles de DA durante la perfusión intra-SL de AVP con un aumento tardío de los niveles de GABA, aunque no estadísticamente significativos.

6.2. Liberación de GABA y glutamato en el SL por perfusión intra-SL AVP

El aumento de GABA que se observa en el SL producida por la perfusión intra-SL de AVP, guarda relación con el estudio electrofisiológico realizado por Raggenbass (2008). En este estudio se demostró que la AVP excita aproximadamente un 40% de las neuronas en el SL mediante la activación de

receptores V_{1A} y que posterior a esto se produce una inhibición de neuronas GABAérgicas en este núcleo. La AVP parece tener un efecto dual en SL: (i) Excitando directamente un subgrupo de neuronas; (ii) Provocando una inhibición indirecta de prácticamente todas las neuronas del SL (Raggenbass et al, 2008). Considerando esto, el aumento de GABA que hemos observado en SL, probablemente podría corresponder a un aumento en la liberación de GABA desde las interneuronas del SL, excitadas por efecto de la perfusión intra-SL de AVP mediante la activación de receptores V_{1A} . De esta forma, el aumento de GABA tendría como consecuencia la inhibición de las neuronas GABAérgicas de proyección.

Aunque medir los niveles de glutamato no era parte de los objetivos de este estudio, en vista de que el SL recibe fuerte transmisión glutamatérgicas desde el Hipocampo (Sheehan et al, 2004), se decidió analizar el efecto que tendría la perfusión intra-SL de AVP sobre los niveles de glutamato en el SL.

La despolarización de las neuronas glutamatérgicas que llegan al SL (Luo et al, 2011) normalmente viene seguida de una hiperpolarización inducida por la liberación de GABA intraseptal de las neuronas lo que mantiene el tono inhibitorio (Sheehan et al, 2004). En nuestros resultados no observamos cambios en los niveles extracelulares de glutamato luego de la perfusión intra-SL de AVP. Esto podría deberse por un lado a una hiperpolarización de los terminales glutamatérgicos producida por el aumento de GABA inducido por AVP. Por otro lado, también podría deberse a que los terminales glutamatérgicos que llegan al SL no expresan el receptor V_{1A} . Si bien se ha observado que el SL tiene una gran

expresión de receptores V_{1A} (Ostrowski et al, 1992), la ubicación de los mismos a nivel presináptico o postsináptico no se conoce.

6.3. Liberación de DA, GABA y glutamato en el VTA por perfusión intra-SL de AVP

Luo y colaboradores (2011) observaron que la conexión SL-VTA es mediante las neuronas GABAérgicas del SL que proyectan directo a las interneuronas GABA del VTA. Estas últimas mantienen un tono inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA (Johnson et al, 1992). Nosotros observamos que la administración de AVP en el SL produce una disminución de DA en el VTA. Vega y colaboradores (2017) mostraron que la estimulación del SL con una solución de K^+ -aCSF 70 mM provoca un aumento en la liberación de GABA y DA en el VTA. Por otro lado, observaron que la inhibición del SL provoca una disminución de los niveles de GABA en el VTA sin alterar los niveles de DA. Además, se ha observado que la administración de tetrodotoxina en el SL bloquea el aumento de DA en el NAcc inducido por alcohol (Jonsson et al, 2017). Esto sugiere que la AVP en el SL estaría provocando indirectamente y mediante la desinhibición de la interneurona GABAérgica del VTA, la disminución de la liberación de DA, aunque no estadísticamente significativa, en el VTA que observamos en nuestros resultados.

En cuanto los niveles de GABA en VTA, estos parecieran no verse afectados durante la perfusión de AVP intra-SL. Suponiendo que las neuronas GABA que proyectan desde el SL se encontraran inhibidas, hubiésemos esperado

detectar un aumento en los niveles de GABA en VTA producido por sus interneuronas. Si durante los primeros 60 minutos de perfusión intra-SL de AVP, la liberación de GABA por parte de la neurona de proyección del SL, disminuyera simultánea y proporcionalmente a medida que aumentara la liberación GABA desde la interneurona GABAérgica que se desinhibe en el VTA, se podría explicar por qué no se observaron cambios significativos en los niveles de GABA en el VTA. Sin embargo, esto no coincide con lo visto por Vega (2015) según lo descrito anteriormente.

Se ha observado que tanto las interneuronas GABAérgicas como las dopaminérgicas en el VTA expresan receptores GABA_A Y GABA_B, sin embargo sólo las interneuronas GABA del VTA expresan receptores GABA_Aα1 (Ciccarelli et al, 2012). El trabajo de Vega y colaboradores (2017) mostró la participación de las interneuronas GABA del VTA en la regulación de la liberación de DA en este núcleo. Realizaron la perfusión intra-VTA de un modulador alostérico positivo del receptor GABA_Aα1 (indiplon) y luego estimularon el SL con K⁺-aCSF 70 mM durante 10 minutos. Observaron que la administración de indiplon en el VTA junto a la estimulación con K⁺-aCSF 70 mM en el SL produce un aumento de los niveles de DA notablemente mayor al aumento observado por la estimulación del SL solamente, lo que avala el efecto inhibitorio de las proyecciones del SL sobre las interneuronas del VTA. Para poder corroborar nuestra hipótesis de que la AVP en el SL produce la inhibición de las neuronas de proyección y activa a las interneuronas GABA del VTA deberíamos probar la administración de un agonista GABA_Aα1, en el VTA junto a la administración de AVP en el SL y observar si ahora no se produce la disminución de la liberación de DA.

Respecto a los niveles de glutamato, no observamos cambios significativos en el VTA luego de la perfusión de AVP intra-SL. Esto concuerda con lo observado por Vega y colaboradores (2017) quienes tanto al estimular como inhibir el SL no observaron cambios en los niveles de glutamato en el VTA.

Sabemos que la AVP juega un rol protagónico en la conducta social y sexual (Dumais et al, 2016). También es conocido que tiene participación en la regulación de conductas tipo adictivas, (Godino y Renard, 2018) aparentemente la perfusión intra-SL de AVP, estaría incrementando la liberación de GABA en el SL mediante la activación de los receptores V_{1A} de las interneuronas GABA. Estas inhibirían las neuronas GABAérgicas que proyectan hacia el VTA, provocando la desinhibición de las interneuronas GABA que se encuentran en este núcleo. De esta forma, las interneuronas GABA desinhibidas provocarían la inhibición de la liberación de DA en el VTA. Se ha visto que la inhibición farmacológica del SL mediante agonistas $GABA_A$ y $GABA_B$, muscimol y baclofeno respectivamente, inhibe la expresión de preferencia por cocaína en la prueba de preferencia de lugar condicionado (Sartor et al, 2012) e inhibe la recaída a la búsqueda de cocaína inducida por contexto (Luo et al, 2011). En comparación, se ha visto que la administración intra-SL de AVP luego del condicionamiento, atenúa la expresión de la conducta de condicionamiento a AMPH en ratas macho (Renard, comunicación personal). Por lo tanto, resulta evidente la relevancia que tendría la AVP sobre la regulación del circuito de la recompensa, modulando desde el SL la liberación de DA en VTA. Esto apunta a los receptores V_{1A} como un posible blanco farmacológico para reducir conductas adictivas.

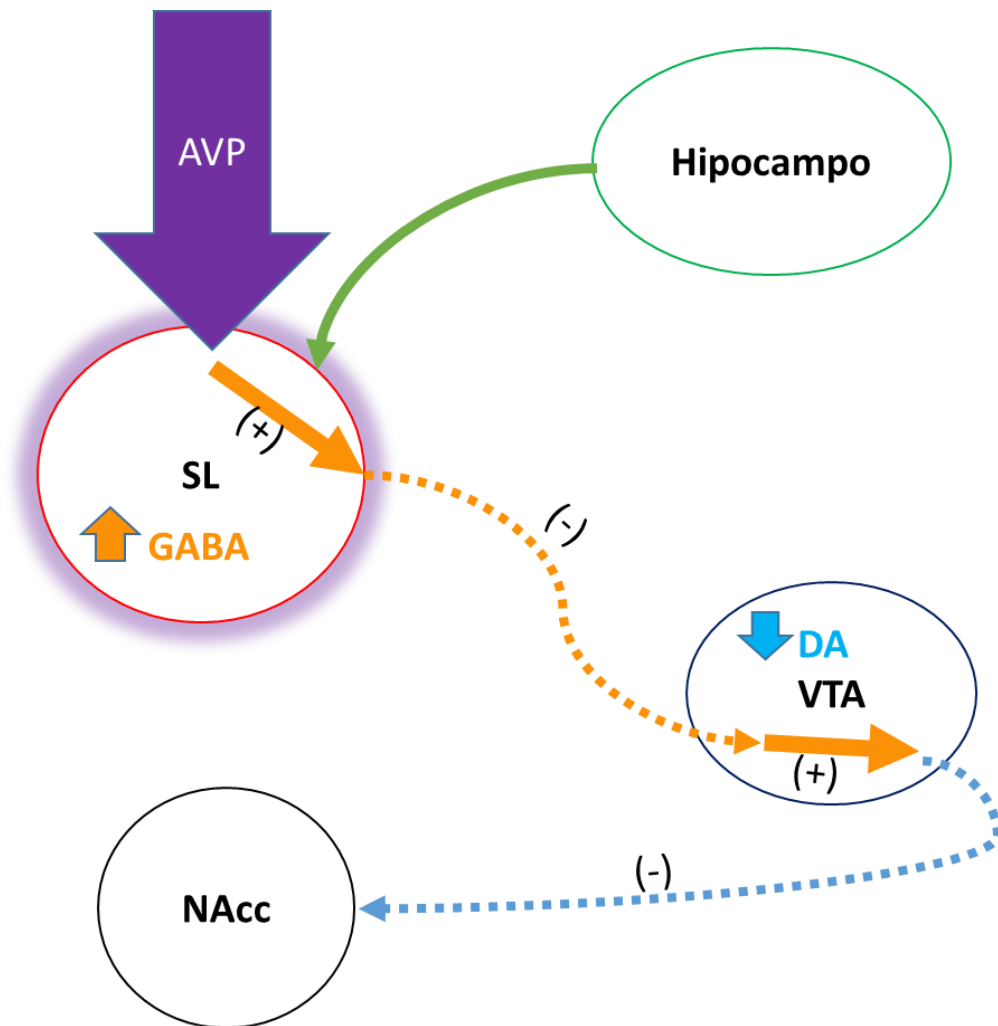


Figura 11. Mecanismo planteado sobre la acción de la perfusión intra-SL de AVP. En verde neuronas glutamatérgicas, en naranja intermitente neuronas GABAérgicas de proyección, en naranja intermitente neuronas GABAérgicas, en celeste intermitente neuronas dopaminérgicas. En flecha violeta, perfusión de AVP intra-SL.

vii.- CONCLUSIONES

- La perfusión intra-SL de AVP produce un aumento de los niveles extracelulares de GABA en el SL, sin producir cambios en los niveles de glutamato.
- AVP en el SL modula los niveles de DA en el VTA produciendo una disminución de este neurotransmisor, aunque no estadísticamente significativa.
- La administración de AVP en el SL podría regular conductas tipo adictivas a través de la modulación del circuito de la recompensa.

viii.- BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada C, Bahamondes C, Cerda CA, Silva RA, Cruz G, Moya PR, Sotomayor-Zárate R, Renard GM. Amphetamine treatment affect the extra-hypothalamic vasopressinergic system in a sex- and nucleus-dependent manner. *J Neuroendocrinol.* 2017; 29(4).
- Assaf SY, Miller JJ. Excitatory action of the mesolimbic dopamine system on septal neurones. *Brain Res.* 1997; 2: 353-360.
- Bosch OJ, Neumann ID. Vasopressin released within the central amígdala promotes maternal aggression. *Eur J Neurosci.* 2010; 31: 883–891.
- Caffe, A.R., van Leeuwen, F.W., Luiten, P.G. Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 1987; 261, 237–252.
- Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young WS 3rd. Vasopressin: behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Prog Neurobiol.* 2008; 84:1-24.
- Ciccarelli A, Calza A, Panzanelli P, Concas A, Giustetto M, Sassoe-Pognetto, M, Organization of gabaergic synaptic circuits in the rat ventral tegmental area. *PloS ONE* 2012; 7, e46250.
- Colussi-Mas J, Geisler S, Zimmer L, Zahm DS, Berod A. Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double-labelling study. *Eur J Neurosci.* 2007; 26:1011-1025.
- De Vries GJ, Buijs RM, Sluiter AA. Gonadal hormone actions on the morphology of the vasopressinergic innervation of the adult rat brain. *Brain Res.* 1984; 298:141-145.

- Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85(14):5274-8.
- Donaldson ZR, Young LJ. Oxytocin, Vasopressin, and the Neurogenetics of Sociality. *Science* 2008 ; 322(5903): 900-904.
- Dumais K, Veenema A, Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. *Front Neuroendocrinol*. 2016; 40, 1–23
- Godino A, Renard GR Effects of alcohol and psychostimulants on the vasopressin system: behavioral implications. *J Neuroendocrinol*. 2018;
- Hernando, F., Schoots, O., Lolait, S. J. and Burbach, J. P. Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinol*. 2001; 142, 1659-1668.
- Johnson A.E, Audigier S, Rossi F, Jard S, Tribollet E, Barberis C, Localization and characterization of vasopressin binding sites in the rat brain using an iodinated linear AVP antagonist, *Brain Res*. 1993; 622: 9–16.
- Johnson SW, North RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci*. 1992; 12 (2): 483-488.
- Jonsson, S Morud, J., Stomberg, R., Ericson, M., Söderpalm, B., Involvement of Lateral septum, in alcohol's dopamine-elevating effect in the rat. *Addict. Biol*. 2017; 22,93.102.
- Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 1997; 278:52–58.

- Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacol.* 2010; 35: 217-238.
- Lukas M, Bredewold, Landgraf R, Neumann I, Veenema A. Early life stress impairs social recognition due to a blunted response of vasopressin release within the septum of adult male rats *Psychoneuroendocrinol.* 2011; 36, 843—853.
- Lukas M, Wöhr M, Endogenous vasopressin, innate anxiety, and the emission of pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations during social playbehavior in juvenile rats. *Psychoneuroendocrinol.* 2015; 56, 35-44.
- Luo AH, Tahsili-Fahadan P, Wise R, Lupica CR, Aston-Jones G. Linking Context with reward: A Functional Circuit from Hippocampal CA3 to Ventral Tegmental Area. *Science.* 2011; 333-353.
- Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol.* 1954;47:419-427.
- Ostrowski NL, Lolait SJ, Bradley DJ, O'Carroll AM, Brownstein MJ, Young WS 3rd. Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. *Endocrinology.* 1992; 131:533-535.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Compact sixth edition. Academic Press. 2009.
- Raggenbass M. Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur J Pharmacol.* 2008; 583(2–3):243–254.
- Risold P Y, Swanson LW. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997; 24:115-195.

- Sartor GC, Aston Jones G. A septal-hypothalamic pathway drives orexin neurons, which is necessary for conditioned cocaine preference. *J Neurosci.* 2012;32(13):4623-31.
- Sheehan TP, Chambers RA, Russell DS. Regulation of affect by the lateral septum implications for neuropsychiatry. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004; 46:71-117.
- Stoop R. Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron.* 2012; 76, 142-159.
- Tzschentke TM, Schmidt WJ. The development of cocaine-induced behavioral sensitization is affected by discrete quinolinic acid lesions of the prelimbic medial prefrontal cortex. *Brain Res.* 1998; 795(1-2):71-6.
- Vega-Quiroga, I., Yarur, H.E., Gysling, K., Lateral septum stimulation disinhibits dopaminergic neurons in the antero-ventral region of the ventral tegmental area: Role of GABA-A alpha 1 receptors, *Neuropharmacol. j.neuropharm.* 2017; doi:10.1016; .09.034.
- Yu GZ, Kaba H, Okutani F, Takahashi S, Higuchi T. The olfactory bulb: a critical site of action for oxytocin in the induction of maternal behaviour in the rat. *Neuroscience.* 1996; 72: 1083–1088.

ix.- ABREVIATURAS

aCSF: Fluido cerebroespinal artificial

ACTH: Adenocorticotrofas

AMPH: Anfetaina

AVP: Arginina-Vasopresina

BNST: Lecho de la Estría Terminalis

cd-LS: Septum Lateral-caudodorsal

DA: Dopamina

EEM: Error Estandar Medio

GLU: Glutamato

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

LSD: Septum Lateral Derecho

LSI: Septum Lateral Izquierdo

MeA: Amígdala Medial

NAcc: Núcleo Accumbens

SL: Spetum Lateral

VTA: Área Tegmental Ventral