

IV MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Animals d'experimentació

S'han emprat rates albiges mascles de la soca Wistar proporcionades per Iffa Credo (Lyon, França) de pes comprès entre 250-320 grams. També s'han utilitzat ratolins mascles de la soca C57BL/6 de 10 a 12 setmanes d'edat en el moment dels experiments (5-HT_{1A} +/+) de 25-30 grams de pes (Iffa Credo, Lyon, França) i ratolins genoanul·lats (*knockout*, KO) del receptor 5-HT_{1A} (5-HT_{1A} -/-). Els ratolins KO presenten el mateix fons genètic que els seus respectius controls (C57BL/6) però amb una delecció de la part inicial del gen que conté el codó d'iniciació, de manera que queda inactivada l'expressió del gen, i per tant, l'aparició de la proteïna funcional. Els ratolins genoanul·lats s'han generat a la Universitat de Princeton (EUA) pel grup del Dr. Miklos Toth mitjançant recombinació homòloga (Parks *et al.* 1998). D'aquesta font inicial alguns individus han estat transferits per tal de fer créixer una colònia estable a l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Els animals es van estabular en grups d'un màxim de 4 (rates) i de 6 (ratolins) per gàbia, en un ambient controlat amb un cicle de 12 hores de llum - fosc i una temperatura ambient de 22 ± 2 °C, disposant de menjar (pinsos comercials) i aigua *ad libitum*. Els animals es mantenen sota aquestes condicions, per a permetre la seua aclimatació, un mínim d'una setmana abans de la realització dels experiments. Després de realitzar la cirurgia (vegeu apartat 2.2.) els animals s'estabulen individualment. La cura i tractament dels animals es realitza segons la legislació europea de "Protecció dels Animals Utilitzats per a Experiments i Altres Propòsits Científics", d'acord amb les normes de la Unió Europea (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986).

1.2. Compostos i fàrmacs emprats

A la taula 2 es detallen els fàrmacs utilitzats en els diferents treballs presentats amb l' activitat farmacològica corresponent.

Fàrmac	Activitat	Fàrmac	Activitat
BAY X 3702	Agonista 5-HT _{1A}	Clozapina	
8-OH-DPAT	Agonista 5-HT _{1A}	Aripiprazol	Antipsicòtics atípics
WAY-100635	Antagonista 5-HT _{1A}	Olanzapina	
DOI	Agonista 5-HT _{2A}	Ziprasidona	
M100907	Antagonista 5-HT _{2A}	Apomorfina	Agonista D2
Ritanserina	Antagonista 5-HT _{2A/2C}	TTX	Bloquejant de canals de Na ⁺
SB 242084	Antagonista 5-HT _{2C}	Haloperidol	Antipsicòtics clàssic
Citalopram	Inhibidor de la recaptació de 5-HT	Clorpromazina	
Nomifensina	Inhibidor de la recaptació de DA	Bicuculina	Antagonista GABA _A
AMPA	Agonista AMPA	Picrotoxinina	Antagonista GABA _A
(+)-MK 801	Antagonista NMDA	Prazosin	Antagonista α1-agrenèrgic
LY-379268	Agonista mGluR II	NBQX	Antagonista AMPA/KA
DAMGO	Agonista μ-opioides	1S,3S-ACPD	Agonista mGluR II/III

Taula 2: Compostos i fàrmacs utilitzats i la seua activitat farmacològica.

2. MÈTODES

2.1. Electrofisiologia: registres extracel·lulars *in vivo*.

2.1.1. Anestèsia

En tots els experiments s'ha utilitzat hidrat de cloral diluït en solució salina al 0.9%. La dosi inial d'hidrat de cloral va ser de 400 mg/kg administrat i.p. Quan l'animal va estar sota els efectes de l'anestèsic es va procedir a la canulació de la vena femoral. En els experiments en els que es mesurava l'activitat de les neurones piramidals de l'escorça prefrontal les dosis addicionals d'anestèsic es van administrar 80 mg/kg via i.v. a intervals de 30/45 min. En aquest cas el registre es va fer entre 10 i 45 min després de l'administració de l'anestèsia per evitar l'efecte agut de l'hidrat de cloral.

Quan vam abordar els experiments de registre de neurones dopaminèrgiques vam trobar que amb l'administració intravenosa de l'anestèsic les neurones descarregaven amb un percentatge de ràfegues molt baix i molt variable. Aquest fet està d'acord amb treballs previs que mostren que les neurones dopaminèrgiques de rates profundament anestesiades amb hidrat de cloral tenen un percentatge de ràfegues molt baix (0.49%) (Fà *et al.*, 2003). La solució que ens va semblar més encertada va ser l'administració de forma continuada amb bomba de perfusió (CMA) a una dosi de 50-70 mg/kg·h via i.p. de manera que s'obté una anestèsia constant evitant els pics de màxim efecte anestèsic produït per les injeccions intravenoses d'hidrat de cloral. D'aquesta manera també obtenim un increment de la estabilitat i del percentatge de descàrregues disparades en forma de ràfega.

2.1.2. Preparació dels animals per a l'estereotàxia

En tots els animals emprats per al registre de neurones dopaminèrgiques es va dur a terme una cirurgia de traqueotomia per minimitzar els efectes depressors respiratoris produït per l'anestèsia. A continuació l'animal es va col·locar en un aparell d'estereotàxia. Amb l'objectiu d'evitar les pulsacions produïdes per la pressió intracraneal es va punxar la membrana atlanto-occipital mitjançant una

agulla i es va drenar líquid cefaloraquídi. La temperatura de l'animal es va mantenir constant a 37° durant tot l'experiment gràcies a una manta termoreguladora (model RTM-1, Cibertec, Madrid) situada entre l'animal i l'extereotàxic.

2.1.3. Preparació dels electrodes

2.1.3.1. De registre

Els electrodes utilitzats per a registrar l'activitat elèctrica es van fabricar a partir de micropipetes de vidre capilaritzades de 2.0 mm de diàmetre (Borosilicate glass capillaries, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA) que es van estirar amb un estirador de vidre ("puller", Narishige model PE-2, Narishige Scientific Instruments, Tokio, Japó). Posteriorment es van omplir amb clorur sòdic 2 M prèviament filtrat. La impedància inicial dels electrodes va ser de 15 a 20 MΩ, que es van reduir *in vitro* a uns valors compresos entre 4 i 10 MΩ. Aquest procés es va dur a terme passant polsos de corrent de 1 a 2 mA durant 500 ms en un circuit tancat amb fils de plata submergits en solució salina mitjançant un estimulador Grass S-48 connectat a una unitat d'aïllament del estímulo Grass SIU 5 (Grass Medical Instruments, Massachusetts, EUA).

2.1.3.2. D'estimulació

Els electrodes bipolars d'estimulació es van fabricar a partir de dos fils d'acer inoxidable recoberts d'un bany aïllant (California Fine Wire Company, Grover Beach, California). Seguidament es va procedir a pelar amb un bisturí totes dues puntes (aproximadament 400-600 μm) i a separar-les uns 100-150 μm.

La fixació dels electrodes d'estimulació al crani de l'animal es va fer amb una primera capa de pegament de cianoacrilat (Super Glue-3 Gel, Loctite®) i una segona de resina autopolimeritzant de metil metacrilat (TAB 2000, Kerr®, Salerno, Italia) per damunt de la primera.

Els estímuls aplicats mitjançant aquest electrodes van ser quadrats i monofàsics, típicament de 0.2 ms i de 0.5 a 2 mA amb una freqüència de 0.9 Hz.

2.1.4. Preparació de cànules per a l'administració local de fàrmacs

Es van utilitzar cànules per a l'administració local de DOI en EPFm de rata. Les cànules es van construir d'acer inoxidable de 32 g (Small Parts Inc., Miami, FL, EUA) unides a una xeringa Hamilton de 10 µL per un tub de tefló. Per a l'administració de fàrmacs es va emprar una bomba de microinfusió (Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN, EUA). Degut a la inèrcia que presenta la bomba de perfusió l'estrategia que feiem servir per estar segurs que el volum de solució desitjat amb el fàrmac havia entrat al cervell era deixar una petita bombolla d'aire en el tub de tefló i marcar el punt del tub on aquesta havia d'arribar en funció del volum que volíem administrar. Aquesta eina resultava molt útil com control del volum administrat.

2.1.5. Registre uni-extracel·lular

2.1.5.1. Característiques del laboratori

Quan l'animal va estar ben posat a l'estereotàxic i implantada la cànula o els electrodes d'estimulació, es procedeix a introduir un electrode de registre que va baixant-se de forma dorso-ventral dins dels cervell de l'animal mitjançant un microposicionador hidràulic d'avanç i precisió micromètrica (model David Kopf 640).

El circuit inicial que recull els potencials de camp generats pels potencials d'acció de les neurones registrades consisteix en un fil de plata introduït dins de l'electrode de registre i d'un electrode de terra enganxat al teixit muscular del coll de l'animal. Els dos cables van a la cèl·lula receptora del senyal elèctric.

Explicat de forma breu, el senyal elèctric s'amplifica en dues fases. Una primera que ho fa 10 vegades amb un primer amplificador (Neurodata IR283, Cygnus Technology Inc., Delaware Water Gap, EUA) i una segona fase realitzada per un post-amplificador que l'amplia unes 50 vegades més al mateix temps que tot filtra soroll elèctric d'una freqüència superior a 1 kHz (Cibertec, Madrid). El senyal obtés inicialment pel primer amplificador va a un oscil·loscopi (305, HAMEG Instruments, Barcelona) que ens permetrà observar el senyal elèctric original. Posteriorment a la post-amplificació i al filtre, el senyal elèctric s'envia a un aparell d'àudio (Cibertec, Madrid) i a l'interfase (DAT Micro1401,

Cambridge Electronic Design, CED; Cambridge, Anglaterra). Finalment, la interfase transforma l'informació analògica en informació digital per a que el programa Spike2 (CED, Cambridge, Anglaterra) pugui adquirir les dades i emmagatzemar-les a l'ordinador.

Adicionalment l'equip disposa d'un estimulador Grass S-48 connectat a una unitat d'aïllament del estímulo Grass SIU 5 (Grass Medical Instruments).

L'esquema del equip de registre utilitzat en els experiments es presenta a la figura 10.

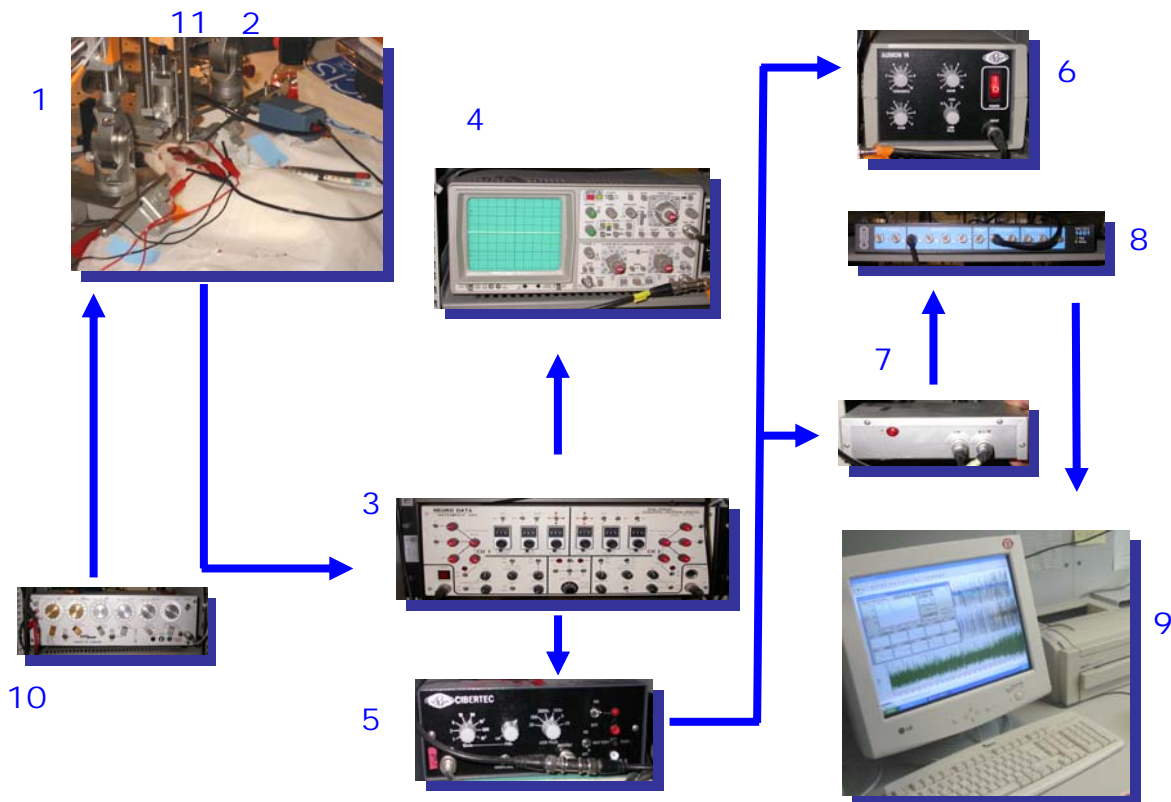


Figura 10. Esquema del equip de registre de l'activitat elèctrica extracel·lular unitària. El senyal es recollit per l'electrode de registre (1), passa per una cèl·lula receptora (2), s'amplifica (3), es monitoritza en un oscil·loscopi (4), es post-amplifica i filtra (5), es transforma en un senyal d'àudio (6) es limita mitjançant un limitador de corrent (per no danyar l'interfase), (7) es transforma en senyal digital per una interfase (8) i es recollida en un ordinador (9) per al seu posterior anàlisi. Adicionalment, es pot generar un estímulo elèctric mitjançant un estimulador (10) que envia l'impuls elèctric a l'electrode d'estimulació (11). Paral·lelament, l'estimulador envia el senyal a l'interfase (8) i a l'oscil·loscopi (4)

2.1.5.2. Registre de neurones dopaminèrgiques de l'àrea tegmental ventral

Per al registre de neurones dopaminèrgiques utilitzem la metodologia descrita a la bibliografia (Grace i Bunney, 1984; Celada et al., 1999). Es va realitzar una trepanació als voltants de la coordenada desde bregma AP: -5.3; L: -0.5 (atlas de Paxinos and Watson, 1998) i es va apartar amb molta cura la duramater per poder introduir l'electrode de registre i baixar-lo entre 7.5 i 9.

Totes les neurones dopaminèrgiques registrades havien de complir una sèrie de característiques durant el registre basal per considerar-les amb fenotip dopaminèrgic: amplitud del potencial d'acció >2.5ms amb una inflexió en la despolarització, descàrrega regular o en ràfegues típiques d'aquest tipus de neurones (Chiodo, 1988) i freqüència de descàrrega típica entre 0.5 i 10 potencials/segon. A més en el sistema d'àudio del laboratori se senten amb un so greu característic que ens permet diferenciar-les de les neurones GABAèrgiques que tenen un so molt més agut. Al final de l'experiment en totes les neurones en les que era possible (la major part d'elles) les caracteritzàvem mitjançant l'agonisme per l'autoreceptor D2 que inhibeix l'activitat de les neurones dopaminèrgiques. La caracterització del fenotip es complementava en molts dels casos amb la localització cerebral del àrea registrada per corroborar que estàvem registrant neurones dopaminèrgiques de l'àrea tegmental ventral i no de altres àrees properes que també tenen neurones del mateix fenotip (substància nigra, nucli vermell magnocel·lular). Amb totes aquestes comprovacions podem estar raonablement segurs de que totes les neurones dopaminèrgiques que formen part dels treballs d'aquesta tesi tenen el fenotip dopaminèrgic.

2.1.5.3. Registre de neurones piramidals de l'escorça prefrontal medial

Per al registre de neurones piramidals corticals es van realitzar trepanacions d'aproximadament 2 mm de diàmetre amb el taladro prenent com a punt mig desde bregma: AP +3.2, L -0.5. Les neurones van ser registrades al voltant d'aquesta coordenada baixant entre 1.0 i 4.0 mm sota la duramater.

Les neurones piramidals es van identificar sistemàticament per a) l'activació antidròmica des de l'àrea tegmental ventral; i b) per col·lisió del potencial

antidròmic amb potencials espontanis. Aquesta metodologia es descriu a Fuller and Schlag, 1976. Les neurones sense estimulació antidròmica es van descartar com possibles neurones piramidals. A la figura 11 es poden veure exemples de la manera d'identificar aquest tipus de neurones.

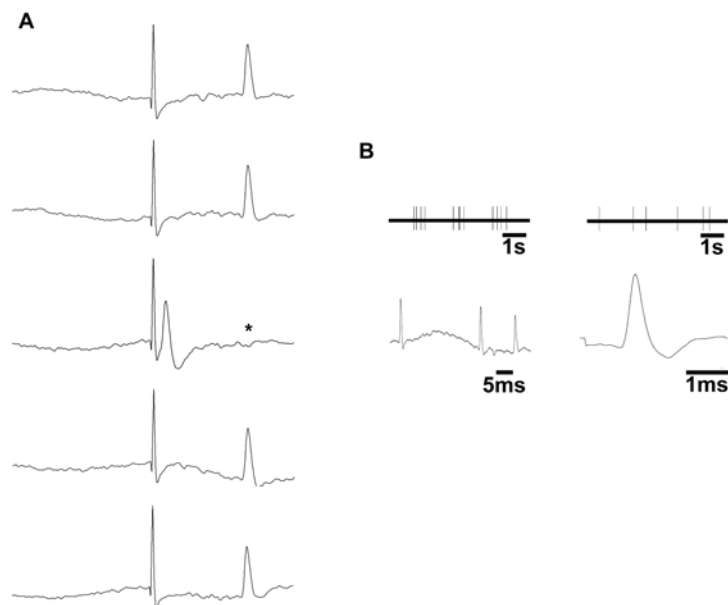


Figura 11. Registres extracel·lulars de neurones piramidals de l'escorça prefrontal medial. A) identificació d'una neurona piramidal de projecció per l'estimulació antidròmica des de l'àrea tegmental ventral. L'asterisc marca un potencial antidròmic no produït degut a la col·lisió amb un potencial d'acció espontani. B) Potencials representatius i patrons de descàrrega diferents de neurones de projecció mostrant descàrrega regular o descàrrega en forma de ràfegues.

2.2. Microdiàlisi intracerebral in vivo

Els experiments de microdiàlisi en rates i en ratolins es van dur a terme essencialment com ja havia estat prèviament descrit (Adell i Artigas, 1991; Amargós-Bosch *et al.*, 2004). Les rates van ser anestesiades amb pentobarbital sòdic (60 mg/Kg i.p.) i implantades amb una sonda de microdiàlisi amb una llargada de membrana de 4 mm a l'EPFm a les coordenades de: AP +3.2, L -0.8, DV -6.0. També es van implantar sondes de microdiàlisi amb una llargada de la membrana d'intercanvi de 1.5 mm a l'ATV (coordenades AP -5.3, L -2.1, DV -8.9, amb un angle vertical de 10° que la situava a L -0.6, DV -8.7). Els

estudis de microdiàlisi en rates en lliure moviment es van efectuar almenys 20 hores després de la cirurgia. Les sondes es van perfundir amb líquid cefal·loraquidi artificial (LCRa) bombejat a 1.5 µl/min. Després de 100 min d'estabilització, es van recollir quatre mostres de 20 min cadascuna abans de l'aplicació local (microdiàlisi reversa) o l'administració sistèmica dels fàrmacs, recollint a continuació successives mostres de dialitzat intracerebral. En la microdiàlisi en rates anestesiades, la velocitat de perfusió va ser de 3 µl/min i les mostres van ser recollides cada 10 min.

En quant als ratolins, la fabricació de les sondes va ser adaptada de la prèviament descrita per a rates. Els procediments quirúrgics i de microdiàlisi van ser idèntics als descrits per a rates en lliure moviment excepte allò relatiu a la dosi d'anestèsia (pentobarbital sòdic, 40 mg/kg i.p.), la llargada de la membrana de diàlisi (2 mm) i les coordenades cerebrals utilitzades per arribar a l'EPFm: AP + 2.2, L -0.2, DV -3.4.

La concentració de dopamina en les mostres de dialitzat cerebral es va determinar per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), utilitzant una modificació del mètode prèviament descrit (Ferré *et al.*, 1994). Els dialitzats en van col·lectar en microvials que contenien 5 µl d'àcid perclòric 10 mM i van ser ràpidament injectats en l'HPLC. La dopamina es va detectar de forma amperomètrica entre 5 i 7.5 minuts amb un límit de detecció de 3 fmol/mostra emprant un potencial d'oxidació de +0.75 V.

En els experiments en els que es van examinar els efectes de l'estimulació elèctrica de l'EPFm en l'alliberament de dopamina a l'ATV, les rates van ser anestesiades amb hidrat de cloral de la mateixa manera que s'ha descrit per als estudis d'electrofisiologia, i es van recollir fraccions de 10 min (fluxe de 3.0 µl/min). Els electrodes d'estimulació (vegeu apartar 2.1.3.2 de materials i mètodes) es van implantar a l'EPFm (AP -3.2, L -0.8, DV -3.0) i es van fixar al crani de la rata amb pegament i ciment dental. Els estímuls van ser de corrent elèctrica constant generats amb una unitat d'estimulació Grass S-48 connectada a una unitat d'aïllament de l'estímul Grass SIU 5. Es van utilitzar tres condicions diferents d'estimulació: E1 (0.9 Hz, 1.5 mA, 0.2 ms), E2 (10 Hz, 0.5 mA, 1 ms) i E3 (20 Hz, 0.5 mA, 1 ms) (Celada *et al.*, 2001).

2.3. Transeccions corticals

Alguns grups de rates, tant als estudis de microdiàlisi com d'electrofisiologia van ser sotmesos a transecció cortical. En els experiments de microdiàlisi la transecció es va dur a terme almenys 20 h abans del començament de la diàlisi i l'anestèsic utilitzat va ser hidrat de cloral (60 mg/kg i.p.). En els experiments d'electrofisiologia la transecció es va fer 1 h abans del començament del registre i l'anestèsia utilitzada va ser hidrat de cloral administrat de forma continua mitjançant una bomba de perfusió (vegeu apartat 2.1.1 de materials i mètodes).

Per realitzar la transecció es va utilitzar una agulla fina de metall (0.6 mm de diàmetre) que es va col·locar a AP +1.0, DV -6.8, L +0.8 i es va moure de forma estereotàxica fins a L +4.8. Per no danyar el sinus venós i tallar totes les aferències prefrontals al cervell mig, la transecció de l'hemisferi dret es va realitzar a les coordenades AP +1.0, DV -6.8, L des de -0.8 fins a -4.8 amb un angle de 20°.

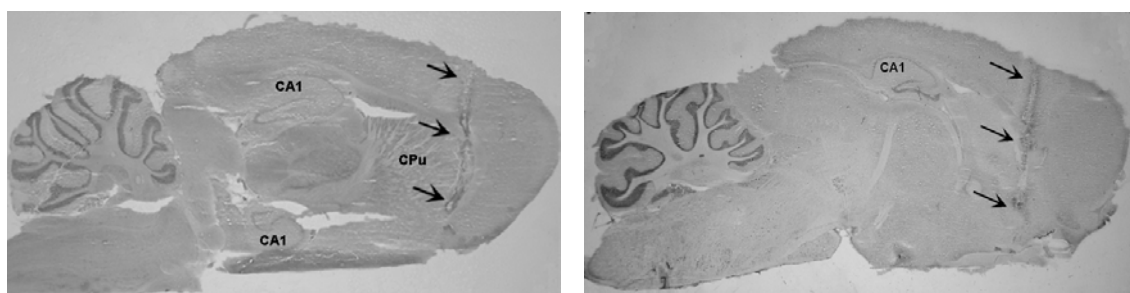


Figura 12. Seccions dels talls sagitals dels cervells de dos rates decorticaades. La coordenada lateral de cada tall es diferent, el de l'esquerra és - 3.4 i el de la dreta és - 3 desde bregma.

2.4. Lesions talàmiques

En el treball 1 es van realitzar lesions electrolítiques de diferents nuclis del tàlem que projecten a l'EPFm, principalment dels nuclis MD i CM. Les lesions van consistir en dos polsos de corrent de 1.5 mA de 10 s de durada cadascun.

Els polsos es van fer en tres coordenades diferents: Coordenada 1: AP -1.8; L -0.7; DV -5.7, Coordenada 2: AP -2.7; L -0.7; DV -6.3 i coordenada 3: AP -3.6; L -0.7; DV -6.5.

Els polsos electrolítics van danyar principalment els nuclis objecte de les lesions, però també van lesionar altres nuclis adjacents que projecten a l'EPFm: nucli paraventricular (PV), paracentral (PC), paratenial (PT) i reuniens.

2.5. Histologia

Al final dels experiments els animals es van matar amb una sobredosi d'anestèsia. Depenent del paràmetre que es volia verificar (localització de la sonda de microdiàlisi, localització dels electrodes d'estimulació, àrea lesionada per la decorticació) els animals van ser perfundits amb solució salina seguida per formalina al 10% (Sigma-Tocris) o bé els cervells es van treure directament i es van congelar amb neu carbònica. Els cervells es van tallar de forma sagital (comprovació d'àrees afectades per la decorticació) o de forma coronal (resta de les comprovacions) en seccions de 70 μm . Els talls obtinguts es van tenyir amb neutral red seguint els procediments habituals. Per verificar els diferents paràmetres es van estudiar les diferents seccions amb un microscopi. Les dades dels animals que no van complir els criteris preestablerts no es van utilitzar.

Per verificar que la zona del cervell on vam registrar les neurones dopaminèrgiques en els experiments d'electrofisiologia en algunes de les rates vam fer marcatges amb pontamina sky blue (figura 13) Així al final de l'experiment es va fer passar un corrent catiònic (20 mA durant 30 min) per l'electrode de registre prèviament ple de NaCl 2M amb pontamina. D'aquesta manera després de realitzar els procediments histològics descrits al paràgraf anterior obteníem una marca d'entre 5 – 10 μm al lloc del cervell on s'havia efectuat el registre. Es pot veure un exemple de comprovació histològica a la figura 13.

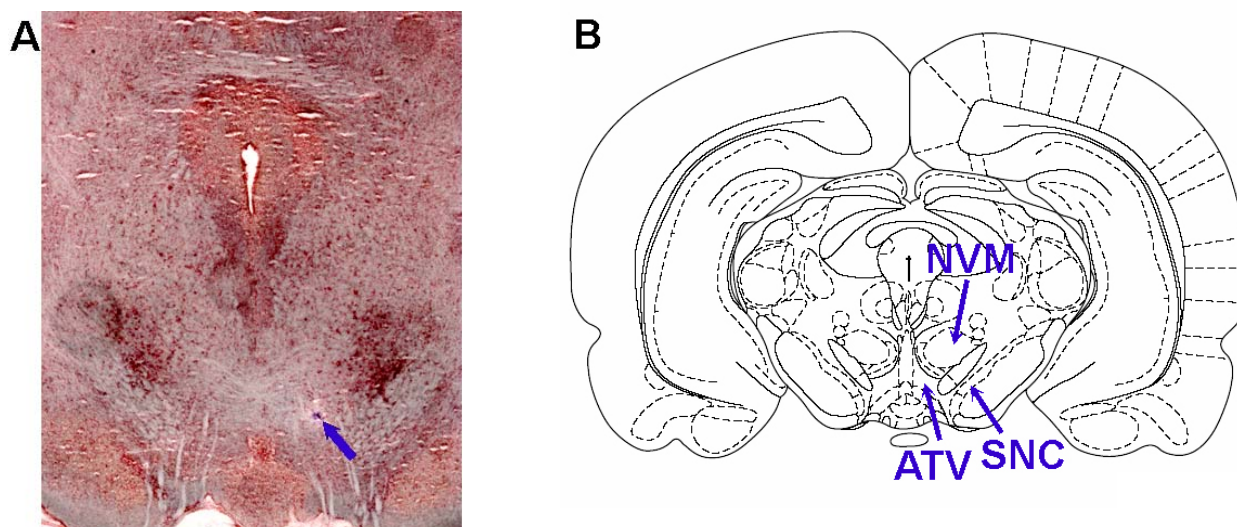


Figura 13. Exemple de comprovació histològica del lloc on s'ha registrat la neurona. A) secció del cervell de la rata on es pot observar la marca de pontamina al final de la fletxa. B) Esquema modificat del atlas del cervell de la rata de Paxinos i Watson (1998) Bregma -5.6 mm on s'han marcat algunes estructures per ajudar a la localització del marcatge: ATV (àrea tegmental ventral); SNC (substància nigra pars compacta); NVM (nucli ventral magnocel·lular).

2.6. Anàlisi estadística de les dades

Els canvis en la freqüència de descàrrega en les neurones dopaminèrgiques i piramidals o en la proporció de descàrrega en forma de ràfegues en les neurones dopaminèrgiques es van establir utilitzant test de la variança (ANOVA) per mesures repetides o test de la t d'Student per dades aparellades. Aquest valors van ser quantificats fent la mitja dels valors durant 3 minuts en les condicions basals i durant 1, 2 o 3 minuts depenent de l'experiment després de les administracions dels diferents fàrmacs (omitint el primer minut).

Els resultats dels estudis de microdiàlisi estan expressats en fmol/fracció i a les figures es mostren com a percentatge dels valor basals (mitges individuals de 4 mostres abans del fàrmac). L'anàlisi estadística es va fer utilitzant test de

la variança (ANOVA) per mesures repetides (una o dues vies) per als valors de dopamina durant els períodes especificats.

Totes les dades estan expressades com la mitja \pm error standard de la mitja. Les dades van ser estadísticament significatives en un 95% de confiança.