

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

---

**“Rol neuroprotector de Modafinilo sobre la  
neurotoxicidad estriatal inducida por  
Metanfetamina en ratón”**

**Bioq. RAINERI ANDERSEN, Mariana**

**Director**

**Dra. BISAGNO, Verónica**

**Co-director**

**Dr. URBANO, Francisco J.**

---

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACOLÓGICAS  
(ININFA-CONICET-UBA)

## AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer uso de estas líneas para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado con la realización del presente trabajo, en especial a la Dra. Verónica Bisagno y al Dr. Francisco J. Urbano, directores de este trabajo de investigación, por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí.

Quiero agradecer a la Facultad de Farmacia y Bioquímica y a la Universidad de Buenos Aires por la formación gratuita y pública que recibí y a la ANPCyT y al CONICET por brindarme el soporte económico para poder financiar esta etapa de mi carrera.

Gracias también a mis queridos compañeros del ININFA, quienes me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos casi cinco años de convivencia. Al personal de apoyo del ININFA entre quienes tengo la obligación de destacar a mis amigas Fer y Meirin y al trabajo de Migue, Lidia, Esther María, Graciela y Gaby por hacerme el peso más liviano. A Ire por haber sido mi guía. A Guto y a Bety por el aporte estadístico y humorístico que le brindaron a mi causa. A Mimi, Cele, Teffy, Juan, Andrés y Vale por haber sido mi compañía en estos años. Gracias a mis queridos amigos Vivi, Ro, Martin y Mer por ser como son y pensar siempre en voz alta conmigo... y sobre todo por ir depurándose cada trasnoche conmigo en busca del acuerdo unánime de la soledad.

Gracias a los chicos del IFIByNE por abrirme sus puertas cada vez que lo necesité, sobre todo a Bel con la que me encuentro en deuda por el apoyo recibido a lo largo de estos años, por su amistad y su colaboración.

Gracias a los chicos de la cátedra de Química Analítica Instrumental por la ayuda recibida y por estar siempre dispuestos a compartir un mate conmigo.

Y en último lugar quiero agradecer muy especialmente la comprensión, la paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos. Gracias a mi papá por ser la regla que uso para medirlo todo y a mi mamá por ser mi colchón amortiguador de caídas. Gracias a Graciela por estar siempre dispuesta a apoyarme en lo que necesite y a Jorge por ayudarme a sacar las papas de fuego.

A todos ellos, muchas gracias.

Parte de los resultados del presente trabajo de tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Raineri, M., González, B., Goitia, B., García-Rill, E., Krasnova, I. N., Cadet, J. L., Urbano, F. J., Bisagno, V. (2012). Modafinil Abrogates Methamphetamine-Induced Neuroinflammation and Apoptotic Effects in the Mouse Striatum. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0046599
  
- Raineri, M., Peskin, V., Goitia, B., Taravini, I. R. E., Giorgeri, S., Urbano, F. J., y Bisagno, V. (2011). Attenuated methamphetamine induced neurotoxicity by modafinil administration in mice. *Synapse (New York)*, 65(10), 1087–98. doi:10.1002/syn.20943

## ABREVIATURAS

- $\alpha$ -MPT:  $\alpha$ -metil-para-tirosina
- 5-HT: Serotonina
- A-Cu-Ag Amino-cupro-argéntica
- ABC; Complejo avidina biotina
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ANF: Anfetamina
- ANOVA; Análisis de la varianza
- ATP: Adenosina trifosfato
- AP-1: Proteína activadora 1
- BHE: Barrera hematoencefálica
- COMT: catecol-o-metiltransferasa
- COX-2: Ciclooxygenasa 2
- CPu: Caudado putamen
- D1R Receptor de dopamina D1
- D2R Receptor de dopamina D2
- DA Dopamina
- DAB: 3,3'-Diaminobencidina
- DAT Transportador de Dopamina
- DDC Dopamina decarboxilasa
- DHHS: Departamento de Salud y Servicios Humanos
- DO: Densidad óptica
- DOI: Densidad óptica integrada
- DOPA: Dihidroxifenilalanina
- DOPAC: Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético
- DMH: Núcleo dorsomedial del hipotálamo
- DMSO: Dimetilsulfoxido
- EAAT: Transportador de aminoácidos excitatorios
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético,
- EFNS: Federación Europea de Sociedades Neurológicas
- EP3: Receptor para prostaglandina de tipo E3
- FDA: Agencia Federal Americana de Drogas y Alimentos
- GABA: Ácido gamma-amino butírico
- GFAP Proteína Ácida Fibrilar Glial
- Glu: Glutamato
- GPi: Globo pálido interno
- GPe: Globo pálido externo
- HVA: Ácido Homovanílico
- HRP: Peroxidasa del rábano
- IC50: Concentración inhibitoria del 50%
- IEGs: Genes de activación temprana
- IL-4: Interleuquina 4
- IL-6: Interleuquina 6
- IL-10: Interleuquina 10
- IL-1 $\beta$ : Interleuquina 1 $\beta$
- ILB4 Isolectina B4
- L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina
- LSD: Mínima diferencia significativa
- LPBel: Núcleo parabraquial lateral externo
- M+M Modafinilo + Metanfetamina

- MAO: Monoamino oxidasa
- MET: Metanfetamina
- MnPO: Núcleo preóptico mediano
- MOD: Modafinilo
- mPOA: Área medial Preóptica
- MK-801: Dizocilpina
- MPP+: 1-metil-4-fenilpiridina
- MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
- MSN: Neurona espinosa mediana
- NA: Noradrenalina
- NAcc: Núcleo Accumbens Core
- NET: Transportador de epinefrina
- NIH: Instituto nacional de salud
- NGS: Suero fetal de cabra
- NMDA: Ácido N-metil-D-aspártico
- NO: Óxido Nítrico
- NOS: Óxido Nítrico Sintasa
- OCT: Transportador de cationes orgánicos
- PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
- PB: Buffer Fosfato
- PBS: Buffer Fosfato Salino
- PBS-T: Buffer Fosfato Salino Tritón
- PCP: Clorhidrato de fenciclidina (polvo de ángel)
- PICB8: Compuesto para cromatografía de intercambio iónico
- PFA: Paraformaldehído
- PGE: Prostaglandina E
- PGE2: Prostaglandina E2
- PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- POA: ÁreaPreóptica
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno
- RNS: Radicales libres del Nitrógeno
- ROI: Región de Interés
- ROS: Radicales libres del Oxígeno
- rRPa: Núcleo de Rafe pálido
- SDS: Dodecilsulfato de sodio
- SNC: Sistema nervioso central
- SNpc: Sustancia Nigra pars compacta
- SNpr: Sustancia Nigra pars reticulata
- StLd: Estriado Lateral Dorsal
- STN: NúcleoSubtalámico
- TAN: Neuronas Tónicamente Activas
- TH: Tirosina Hidroxilasa
- TMD: Dominio transmembrana
- TNF- $\alpha$ : Interferón  $\alpha$
- VMAT: Transportador Vesicular de Monoaminas
- VTA: Área Tegmental Ventral

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>12</b>
<b>A. CONSIDERACIONES PRELIMINARES</b>	<b>12</b>
<b>B. SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIATAL</b>	<b>13</b>
I. Fisiología de los ganglios de la base	13
II. Arquitectura del Estriado	15
III. Neurotransmisión dopaminérgica	17
<b>C. METANFETAMINA</b>	<b>21</b>
I. Acción Farmacológica	21
II. Formas de consumo	22
III. Efectos secundarios	23
IV. Abordaje terapéutico	23
<b>D. MODAFINILO</b>	<b>24</b>
I. Acción Farmacológica	24
II. Farmacocinética	25
III. Efectos Clínicos	25
IV. Usos terapéuticos	26
<b>E. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO I: Evaluación de la capacidad neuroprotectora de modafinilo sobre la neurotoxicidad inducida por la administración aguda de metanfetamina en ratones macho.</b>	
<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	<b>30</b>
<b>B. METODOLOGÍA</b>	<b>34</b>
I. Animales	34

II. Protocolo de administración de drogas	34
III. Respuesta locomotora en campo abierto	35
IV. Análisis de conductas estereotipada	36
V. Determinación de catecolaminas por HPLC	36
VI. Inmunohistoquímica	36
a. Obtención y procesamiento del tejido	36
b. Inmunohistoquímica colorimétrica para TH	37
c. Cuantificación de la densidad óptica integrada	38
VII. Análisis estadístico	40
<b>C. RESULTADOS</b>	<b>41</b>
I. Estudio del efecto estimulante de MOD y MET a dos dosis distintas	41
a. Respuesta locomotora en campo abierto	41
b. Conductas estereotipadas	43
II. Estudio del efecto neuroprotector de MOD luego de un <i>binge</i> de MET	44
a. Locomoción espontánea	44
b. Cambios neuroquímicos	45
<b>D. DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO II: Evaluación de la capacidad neuroprotectora de modafinilo sobre la neurotoxicidad inducida por metanfetamina en ratones hembra.</b>	
<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	<b>53</b>
<b>B. METODOLOGÍA</b>	<b>54</b>
I. Animales	54
II. Protocolo de administración de drogas.	54
III. Respuesta locomotora en campo abierto	54
IV. Cuantificación de catecolaminas por HPLC	55
V. Análisis de la coordinación motora mediante el uso del Rotarod	55
VI. Técnicas histoquímicas	55
a. Obtención del material histológico	55
b. Inmunohistoquímica colorimétrica para TH	56
c. Inmunohistoquímica colorimétrica para DAT	56

d. Cuantificación de la densidad óptica integrada para DAT	56
VII. Análisis estadístico	56
<b>C. RESULTADOS</b>	<b>57</b>
I. Interacción de MOD y MET durante un protocolo de <i>binge</i> :	57
a. Respuesta locomotora en campo abierto	57
II. Estudiar el efecto neuroprotector de MOD frente a la depleción dopaminérgica inducida por el tratamiento con MET:	59
a. Depleción de dopamina en el estriado.	59
b. Locomoción espontánea.	60
c. Coordinación motora (RotaRod)	61
III. Estudiar el efecto neuroprotector de MOD frente a la toxicidad dopaminérgica inducida por MET en el estriado según:	61
a. Alteraciones histológicas dopaminérgicas en el Estriado	61
b. Inmunomarcación para TH en el estriado	62
c. Inmunomarcación para el DAT	64
<b>D. DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO III: Evaluación del efecto de modafinilo sobre la activación glial, apoptosis y activación c-Fos/FosB mediada por metanfetamina.</b>	
<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	<b>69</b>
<b>B. METODOLOGÍA</b>	<b>74</b>
I. Animales	74
II. Protocolo de administración de drogas.	74
III. Técnicas histoquímicas	74
a. Obtención del material histológico	74
b. Inmunohistoquímica colorimétrica para GFAP, c-Fos y FosB.	74
c. Cuantificación del área inmunorreactiva para GFAP	75
d. Cuantificación del número de neuronas positivas para c-Fos o FosB	75
e. Histoquímica colorimétrica para Isolectina-B4 (ILB4)	76
f. Cuantificación de la activación de la microglía	76
IV. Técnica de Plata	77
a. Obtención del material histológico	77



b. Técnica Cupro-Amino-Argéntica	77
V. Determinación de BAX y Bcl-2 por Western Blot	78
VI. Análisis estadístico	78
<b>C. RESULTADOS</b>	<b>79</b>
I. Estudio de la activación de genes de expresión temprana en el estriado	79
a. Activación de c-Fos en el estriado.	79
b. Activación de FosB en el estriado.	80
II. Analizar la activación de células de la glía	82
a. Activación de la Astrogλία	82
b. Activación de la Microglía	84
III. Caracterizar el efecto de la administración de MOD sobre la expresión de proteínas relacionadas con eventos apoptóticos (BAX y Bcl-2) inducida por MET en el estriado	86
a. Estudiar el curso temporal de la degeneración terminal inducida por MET en el estriado según la técnica Amino-Cupro-Argéntica	86
b. Caracterizar el efecto de la administración de MOD sobre la expresión de BAX y Bcl-2 inducida por MET en el estriado	87
<b>D. DISCUSIÓN</b>	<b>88</b>
 <b>CAPÍTULO IV: Análisis del rol de la regulación de la temperatura corporal en el mecanismo de acción neuroprotectora de modafinilo sobre la neurotoxicidad inducida por metanfetamina.</b>	
<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	<b>93</b>
<b>B. METODOLOGÍA</b>	<b>96</b>
I. Animales	96
II. Registro de la temperatura rectal	96
III. Técnicas histoquímicas	96
IV. Análisis estadístico	97
<b>C. RESULTADOS</b>	<b>98</b>
I. Analizar los cambios de la temperatura corporal cuando los tratamientos son administrados a diferentes temperaturas externas:	98

II. Estudiar el efecto neuroprotector de MOD frente a la toxicidad estriatal inducida por MET cuando el tratamiento es administrado a distintas temperaturas.	102
a. Marcadores dopaminérgicos en el Cuerpo Estriado	102
b. Respuesta de la astrogliá en el estriado	105
III. Analizar la correlación existente entre la temperatura máxima corporal y la alteración de los marcadores de toxicidad estudiados.	107
IV. Estudiar la repercusión del cambio de temperatura corporal sobre la expresión de genes de activación temprana en el estriado.	109
a. Expresión de c-Fos en el estriado	109
b. Expresión de FosB en el estriado	110
V. Evaluar el efecto de MOD frente a la activación de áreas hipotalámicas relacionadas con la regulación de la temperatura corporal inducida por MET cuando el tratamiento es administrado a distintas temperaturas	113
a. Expresión de c-Fos en el mPOA (Área Preóptica Media)	113
b. Expresión de c-Fos en el MnPO (Núcleo Preóptico Mediano)	114
<b>D. DISCUSIÓN</b>	<b>116</b>
<b>INTEGRACIÓN FINAL</b>	<b>120</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>127</b>
<b>APÉNDICE I: Construcción y uso de macros para la automatización de la cuantificación de imágenes mediante el uso del software ImageJ.</b>	
<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	<b>129</b>
<b>B. METODOLOGÍA</b>	<b>129</b>
<b>APÉNDICE II: Aproximación a los cambios electrofisiológicos inducidos por metanfetamina, modafinilo y la combinación de ambos estimulantes.</b>	
<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	<b>131</b>
<b>B. METODOLOGÍA</b>	<b>132</b>
<b>C. RESULTADOS</b>	<b>133</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>135</b>

## RESUMEN (600 palabras)

La metanfetamina (MET) es una droga estimulante altamente adictiva cuyo uso es perjudicial el funcionamiento del Sistema Nervioso Central. MET afecta principalmente los terminales de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, responsable entre otras cosas de la regulación motora, siendo su disfunción causante de los problemas motrices presentes en la enfermedad de Parkinson. Además, el consumo de MET altera el funcionamiento de áreas involucradas en funciones cognitivas y áreas que forman parte del sistema de recompensa (sistema mesolímbico). Estos cambios contribuyen al deseo de consumir la droga y al desarrollo de déficits cognitivos observados frecuentemente en pacientes adictos a MET.

El modafinilo (MOD) es un compuesto con propiedades estimulantes aprobado para tratar desordenes de excesiva somnolencia. MOD es actualmente utilizado fuera de sus usos aprobados como terapia de reemplazo para tratar la dependencia a otros estimulantes como MET. A su vez, MOD es comúnmente utilizado como mejorador cognitivo en poblaciones universitarias quienes lo consumen para mejorar su rendimiento académico y puede ser usado en pacientes con déficits cognitivos causados por el consumo de MET. Por ultimo, MOD mostró tener propiedades neuroprotectoras frente al daño dopaminérgico de la vía nigroestriatal inducido por la administración de la toxina MPTP en un modelo de Parkinson, razón por la cual podría proteger frente al daño inducido por MET sobre esta misma vía.

Es por lo anteriormente mencionado que los objetivos de esta tesis fueron estudiar los efectos agudos sobre la conducta de la administración conjunta de ambos estimulantes y el posible efecto neuroprotector de la administración de MOD frente al daño dopaminérgico inducido por MET.

De los resultados de esta tesis se desprende que MOD a una dosis de 90 mg/kg protege frente al daño inducido por un *binge* de MET en ratones macho y hembra. La administración de MOD además previno la respuesta inflamatoria observada en el estriado luego de la administración de MET, la alteración en el balance de la expresión de las proteínas apoptóticas BAX y Bcl-2. MOD, a su vez, previno la hipertermia observada luego de la administración de MET, variable que exacerba la toxicidad de MET.

La administración de MOD junto con un binge de MET derivó en un cambio en el patrón de conducta motora hacia la expresión de conductas estereotipadas. Esto podría indicar que la interacción aguda de ambos compuestos potencia el efecto agudo de MET sobre la conducta, hecho que se condice con el aumento de activación neuronal en el estriado observado luego de la administración de ambos estimulantes.

Finalmente MOD resultó ser neuroprotector tanto en ratones hembra como en ratones macho y él por si mismo no mostró inducir alteraciones sobre los marcadores de toxicidad estudiados. Confirmando de este modo la seguridad de su consumo y los potenciales beneficios de su uso en el tratamiento de pacientes adictos a MET.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### A. CONSIDERACIONES PRELIMINARES

La metanfetamina (MET) es una sustancia ilegal de alto poder adictivo y su consumo prolongado en altas dosis produce efectos perjudiciales sobre el funcionamiento del Sistema Nervioso Central (SNC). Se trata de una droga de abuso con propiedades estimulantes que incrementa los niveles de dopamina en el espacio sináptico y que además puede producir un efecto neurotóxico. MET afecta principalmente terminales de neuronas dopaminérgicas cuyos somas se encuentran en la sustancia nigra y cuyos axones proyectan al núcleo estriado que constituye el núcleo de entrada de información hacia los ganglios basales (Granado y cols., 2010). La vía nigroestriatal es la responsable de la regulación motora y su disfunción es la causante de los problemas motrices presentes en la enfermedad de Parkinson. De hecho, el uso prolongado de MET puede causar trastornos severos del movimiento y síntomas similares a los que se observan en esta enfermedad (Thrash y cols., 2009).

Si bien hasta la fecha no existen fármacos aprobados para tratar con éxito la dependencia a psicoestimulantes, modafinilo (MOD), otra droga con propiedades estimulantes y cuyo uso está aprobado por la FDA (Agencia Federal de Drogas de los EE.UU.) para el tratamiento de desórdenes de excesiva somnolencia, ha comenzado a ser utilizado de modo "off-label" (fuera de los usos específicos que se han aprobado y que figuran en el prospecto) para tratar la dependencia a cocaína y a MET (Ballon y Feifel, 2006), siendo promisorios los resultados de varios estudios clínicos realizados con adictos crónicos a MET (De La Garza 2009, McGaugh 2009).

MOD además ha mostrado tener acciones neuroprotectoras frente al daño dopaminérgico inducido por la administración de MPTP en un modelo de Parkinson (Van Vliet y cols., 2008). Modafinilo es capaz de bloquear el transportador de DA (DAT) (Volkow y cols., 2009). Dado que los bloqueantes del DAT han resultado efectivos en prevenir los cambios neurotóxicos inducidos por MET (Fumagalli y cols., 1998, Marek y cols., 1990), resulta de particular interés el estudio de las propiedades protectoras de MOD sobre la neurotoxicidad estriatal inducida por MET en ratón.

## B. SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIATAL

### I. Fisiología de los ganglios de la base

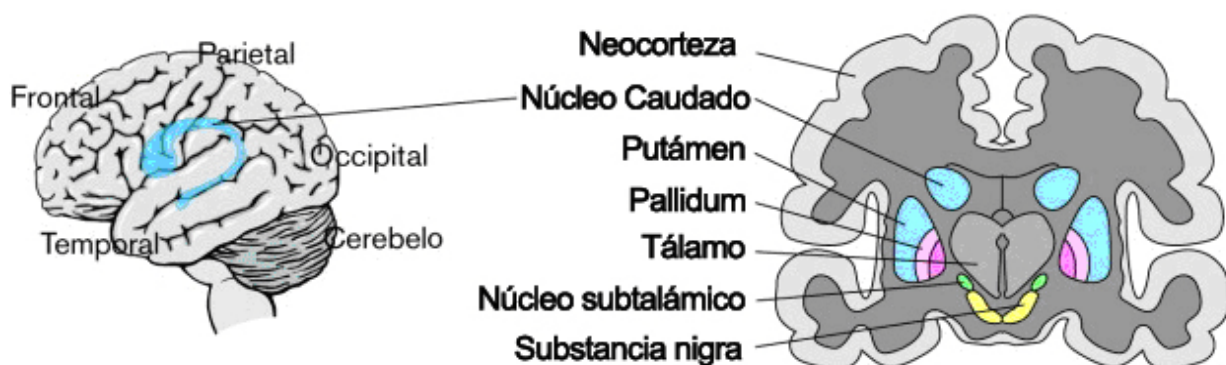
Los ganglios de la base son grandes estructuras neuronales subcorticales que forman un circuito de núcleos interconectados entre sí cuya función comprende el planeamiento, la iniciación, el control y la integración de conductas motoras. Ellos reciben información de la corteza cerebral y del tronco del encéfalo, la procesan y la envían nuevamente a la corteza, al tronco y a la médula espinal para contribuir así con la coordinación del movimiento. Las estructuras que componen este circuito se pueden categorizar según su anatomía o su función (Crittenden y Graybiel 2011).

Anatómicamente, los ganglios basales se dividen en núcleo caudado y el núcleo lenticular. Este último a su vez está formado por el núcleo putámen y el globo pálido externo (GPe) e interno (GPi) como se muestra en la **Tabla 1**.

ESTRUCTURA NEUROLÓGICA	NUCLEOS BASALES
Núcleo lenticular	Globo pálido + putámen
Cuerpo estriado	Núcleo caudado + núcleo lenticular
Neostriado (estriado dorsal)	Núcleo caudado + putámen
Estriado ventral	Núcleo Accumbens
Estriado	Núcleo caudado + putámen + núcleo Accumbens

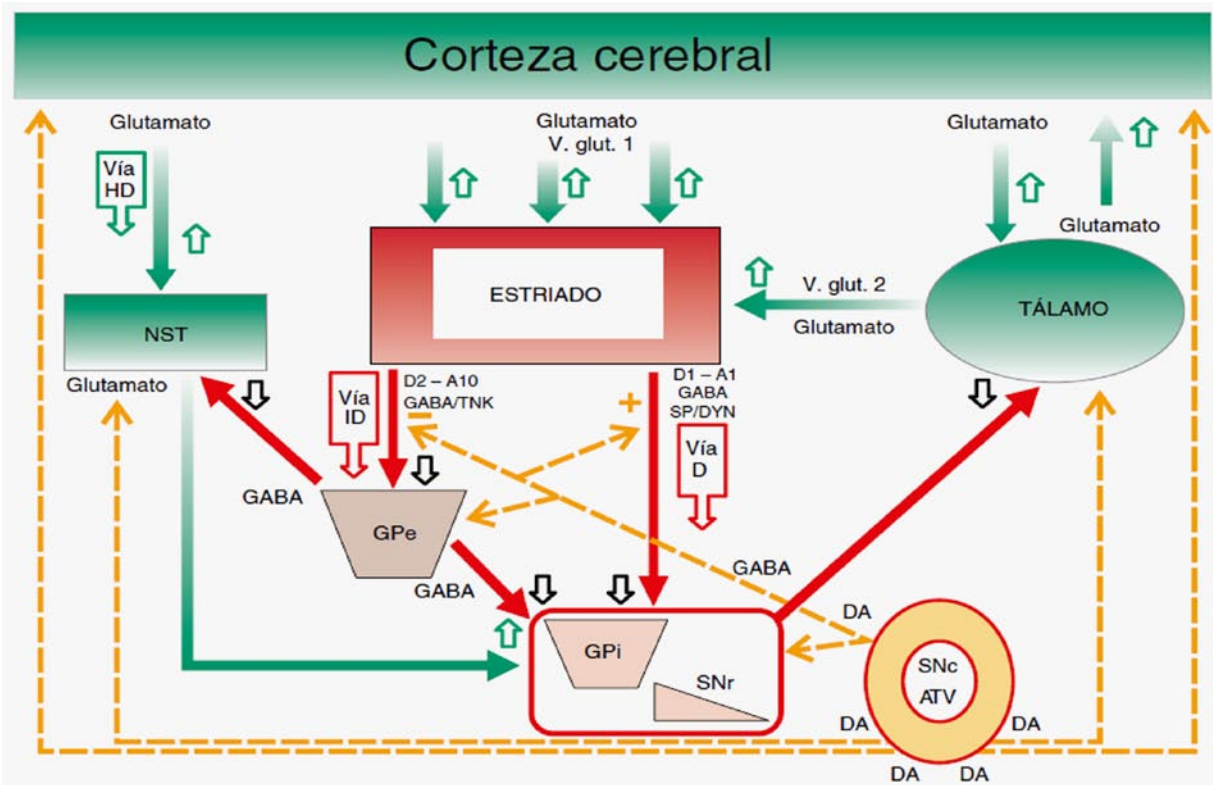
**Tabla 1.** Terminología utilizada para describir los ganglios de la base.

Funcionalmente, los ganglios de la base se dividen en el estriado (formado por el núcleo caudado, el núcleo putámen y el núcleo accumbens), el globo pálido, la sustancia nigra (SNpc y SNr) y el núcleo subtalámico, como se muestra en la **Figura 1** (STN, Graybiel 2000).



**Figura 1. División anatómica de los ganglios de la base (Graybiel 2000).** Esquema que muestra las regiones principales que componen los ganglios de la base. Se muestran el estriado (azul), formado por el NAcc y el putamen; el globo pálido (rosa); el STN (verde) y la sustancia nigra (amarillo).

El estriado es la vía de entrada a los ganglios basales y recibe proyecciones de la corteza cerebral, del tálamo, y de estructuras del tronco del encéfalo como la SNpc, del núcleo pedúnculo pontino, del núcleo dorsal del rafe y del locus coeruleus (Herrero y cols., 2012). Las vías estriatales eferentes se dividen clásicamente en la vía directa y la vía indirecta dependiendo del receptor de dopamina (DA) presente en las neuronas espinosas medianas (MSN). Aquellas MSN que expresen los receptores dopaminérgicos de tipo 1 (D1R) liberarán GABA en el GPI y la SNr, inhibiéndolos. Estos núcleos, a su vez, inhiben al tálamo, permitiendo la activación de la corteza frontal y en consecuencia una mayor activación de la corteza motora. Por otro lado, la activación de la vía indirecta se encuentra normalmente inhibida a causa de la activación de los receptores dopaminérgicos de tipo D2 (D2R) que deriva en una menor liberación de GABA al STN. Este núcleo, ahora desinhibido, activa al GPI que inhibe al tálamo lo que deriva en la inhibición de la corteza motora, tal como se muestra en la **Figura 2**.



**Figura 2. Circuitos de los ganglios basales (Herrero y cols., 2012).** Se indican en rojo los núcleos y las neuronas de carácter inhibitorio y en verde, los núcleos y las neuronas de carácter excitatorio. Las proyecciones dopaminérgicas desde el mesencéfalo ventral se marcan en naranja (nótese las propiedades moduladoras de la dopamina en todos los núcleos implicados en el circuito). Los números representados en las áreas y vías corresponden a los receptores glutamatérgicos metabotrópicos. ATV: área tegmental ventral, GPe: globo pálido externo, GPI: globo pálido interno, NST: núcleo subtalámico, SNc: sustancia negra compacta, SNr: sustancia negra reticulada, vía D: vía directa, vía ID: vía indirecta, vía HD: vía hiperdirecta, DA: dopamina, SP: sustancia P, DYN: dinorfina, TNK: metencefalina.

En conclusión, en presencia de dopamina se activa la vía y se inhibe la vía indirecta, lo que resulta en la activación de la corteza motora.

## II. Arquitectura del Estriado

El estriado contiene diferentes tipos neuronales (con diferentes neurotransmisores y neuromoduladores) involucrados en el control de la activación/inhibición de las neuronas eferentes (Levesque y cols., 2003). Las neuronas que lo componen comprenden las neuronas de proyección, las interneuronas y las neuronas “dopaminérgicas intrínsecas” (Tabla 2).

<i>Espinas dendríticas</i>	<i>Espinosas (neuronas de proyección)</i>				<i>No espinosas (interneuronas)</i>		
Diámetro (en $\mu\text{m}$ )	Medio (10 a 20)				Gigantes (25 a 45) (más pequeñas en el estriado ventral)	Medio (12-25)	Medio (16-18)
Transmisores	GABA Sustancia P - Dinorfina		GABA Encefalina		Acetilcolina	GABA Óxido nítrico Somatostatina Neuropeptido Y	GABA
Receptores de DA	D <sub>1</sub>		D <sub>2</sub>		D <sub>2</sub>	-	-
Compartimento	Matriz	Estriosoma	Matriz	Estriosoma	Matriz	Ambos	Estriosoma
Proteínas ligadoras de calcio	Calbindina		Calbindina		Calretinina	Calbindina	Parvalbúmina
Aferencias	Corteza cerebral (todas las áreas), capas superficiales del tálamo	Corteza cerebral (áreas frontales), capas profundas del tálamo	Corteza cerebral (todas las áreas), capas superficiales del tálamo	Corteza cerebral (áreas frontales), capas profundas del tálamo	Corteza cerebral Tálamo	Corteza cerebral	Corteza cerebral
Proyecciones	GPI - SNr		GPe - SNc		Interneuronas		
Colaterales	En su campo dendrítico local		Toda la matriz		En la matriz	Densas locales	Locales
Receptores de glutamato	Ionotrópicos: GluR 2/3, 5/6/7 NR1, NR2A/2B Metabotrópicos: mGluR1 y 5; mGluR2 y 3*; mGluR4 y 7*		Ionotrópicos: GluR 2/3, 5/6/7 NR1, NR2A/2B Metabotrópicos: mGluR1 y 5; mGluR2 y 3*; mGluR4 y 7*		GluR 5/6/7 NR1, NR2A/2B VGluR3 mGluR1 y 5	GluR 5/6/7 NR1, NR2A/2B	GluR 2/3, 5/6/7 NR1, NR2A/2B
Receptores de adenosina	A <sub>1</sub>		A <sub>2A</sub>		A <sub>1</sub> - A <sub>2A</sub>		
Endocannabinoides	CB1		CB1				
Descargas	Descargas fásicas				Tónica (2-10 Hz)	Variable	Fásica (alta)

**Tabla 2. Características de las neuronas de proyección y las interneuronas estriatales (Herrero y cols., 2012).** GluR, receptor de glutamato. (\*) También presentes en la glía. DA: dopamina, GPI: globo pálido interno, GPe: globo pálido externo, SNr: sustancia negra reticulada, SNc: sustancia negra compacta.

Las neuronas de proyección son las más abundantes dentro del estriado. Son de tamaño mediano, ovaladas o redondas, y poseen numerosas espinas dendríticas. El patrón de descarga de estas neuronas varía con el potencial de membrana. Además, la descarga de potenciales de acción puede estar seguida de períodos de inactividad en forma secuencial. Todas las neuronas de proyección son gabaérgicas y, aunque morfológicamente todas son iguales, se diferencian en dos tipos según contengan sustancia-P, dinorfina y expresen receptores para dopamina de tipo D1 o según co-expresen metencefalina junto con receptores



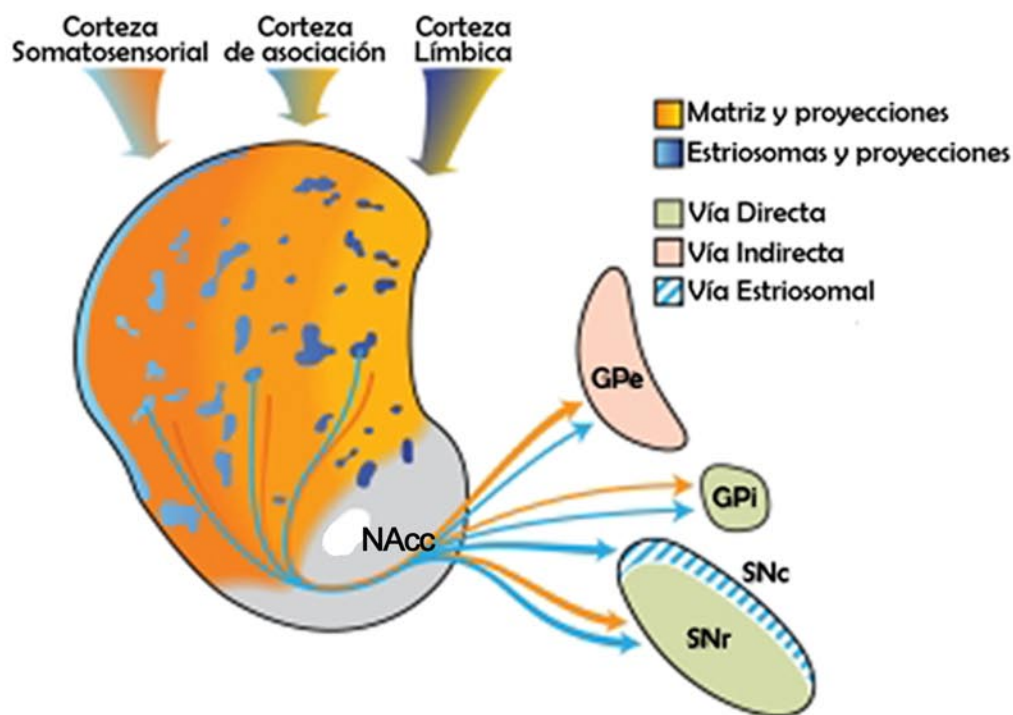
de tipo D2 en su membrana (Parent y Hazrati, 1995, Wise y cols., 1996). La proporción de neuronas de proyección respecto de las interneuronas varía en la escala filogenética desde los roedores (9:1) hasta los primates (3:1) (Graveland y Di Figlia, 1985), pudiendo unas pocas interneuronas inhibir más de cien neuronas de proyección (Koos y Tepper, 1999).

Las interneuronas estriatales se clasifican en colinérgicas gigantes o gabaérgicas de pequeño-mediano tamaño. Las interneuronas modulan la actividad de las proyecciones corticoestriatales a través de una facilitación por parte de las interneuronas colinérgicas o de una depresión ejercida por interneuronas gabaérgicas que contienen óxido nítrico (Centonze y cols., 1999). Las neuronas colinérgicas son tónicamente activas (TAN; Aosaki y cols., 1995) y su actividad se encuentra dinámica y cooperativamente sincronizada con la actividad de las neuronas dopaminérgicas. Las interneuronas gabaérgicas forman circuitos locales dentro del estriado y sus axones sinapsan con neuronas de proyección u otras interneuronas (Tepper y cols., 2004). Las interneuronas gabaérgicas pueden ser nitrérgicas (liberan óxido nítrico en estados de despolarización prolongados), positivas para parvalbúmina (de rápida descarga y bajo umbral de despolarización) ó positivas para calretinina (Herrero y cols., 2012).

Finalmente, cabe mencionar que también ha sido descrita la presencia de neuronas intrínsecas del estriado que son positivas para tirosina hidroxilasa tanto en roedores como en humanos (Porrit y cols., 2000, Tashiro y cols., 1989). Estas neuronas se encuentran aumentadas en número luego de la degeneración del sistema nigroestriatal (Betarbet y cols., 1997).

Estructuralmente el estriado es un núcleo heterogéneo que adopta una forma de mosaico en la que se distinguen dos compartimentos. Uno de los compartimentos constituye la matriz y el otro contiene a los estriosomas (o parches) que representan un 10-20% del volumen del estriado (Graybiel y Ragsdale, 1978; Herkenham y Pert, 1981). Ambos compartimentos se diferencian tanto en sus aferencias como en sus eferencias (Holt y cols., 1997), siendo comúnmente asociada la función de los estriosomas con el sistema sensorial motor y la función de la matriz relacionada con el sistema límbico y ejecutivo. No obstante, ambos compartimentos se encuentran ampliamente interconectados como puede observarse en la **Figura 3**.

De forma análoga a lo que se ocurre en la rata (**Figura 3**) el estriado dorsal en los primates se compone del núcleo caudado (dorsomedial) y putámen (dorsolateral) y el estriado ventral del núcleo accumbens (NAcc; Crittenden y Graybiel 2011). En los primates el núcleo caudado controla las funciones asociativas y cognitivas mientras que el putámen es responsable del componente motor. Finalmente, el NAcc integra y modula las funciones relacionadas con las emociones, la motivación y los mecanismos de recompensa incluidos en los circuitos de la adicción (Wheeler y Carelli 2009). Debe resaltarse que el estriado no es homogéneo ni en sus conexiones, ni en la segregación de sus funciones, ni en la distribución de sus neuronas y que ninguna de las delimitaciones hechas anteriormente es absoluta (Graybiel 1990).



**Figura 3. Esquema de la división compartamental del estriado en la rata (Crittenden y Graybiel 2011).** Modelo de las proyecciones de las vías directa e indirecta y estriosomal del estriado dorsal. Los estriosomas se muestran en azul y la matriz en naranja. El sombreado de derecha (medial) a izquierda (lateral) representa los dominios límbico, de asociación y sensorial motor del estriado. Las flechas indican la vía a la que pertenecen las eferencias GABAérgicas.

### III. Neurotransmisión dopaminérgica

Existe una amplia evidencia de que las drogas estimulantes ejercen su acción a través del sistema dopaminérgico (Berke y Hyman, 2000). La DA constituye un 80% de las catecolaminas del cerebro (Vallone y cols., 2000) y es sintetizada principalmente en las terminales axonales de sustancia nigra y del área tegmental ventral (VTA) a partir del aminoácido L-tirosina incorporado con la dieta. Este aminoácido atraviesa la barrera hemato encefálica (BHE) y es

convertido a dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por acción de la tirosina hidroxilasa (TH) (Daubner y cols., 2011), siendo éste el paso limitante en su síntesis. La L-Dopa es posteriormente transformada en DA por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (DOPA descarboxilasa) e ingresada a través del transportador vesicular de monoaminas de tipo 2 (VMAT2) a las vesículas citoplasmáticas donde es almacenada hasta su liberación.

Luego de ser liberada, la DA es recaptada hacia en interior de la neurona presináptica a través del transportador de DA (DAT) y hacia las células de la glía que rodean la brecha sináptica (Giros y cols., 1992). La DA también sería capturada hacia las neuronas postsinápticas a través del transportador de cationes orgánicos (Busch y cols., 1998). Dentro de las células, la DA es metabolizada por la COMT que cataliza la metilación de la DA para producir 3-metoxitiramina y por la MAO (expresada en la membrana mitocondrial) que cataliza reacciones de deaminación (Kopin 1985). Como se muestra en la **Figura 4**, de la acción de ambas enzimas se produce el ácido homovanílico (HVA) (Kopin, 1985). Debido a la escasez de ARNm de la enzima COMT en neuronas dopaminérgicas y células de la glía, se cree que esta enzima se localiza en neuronas postsinápticas unida a membranas (Tunbridge y cols., 2006).

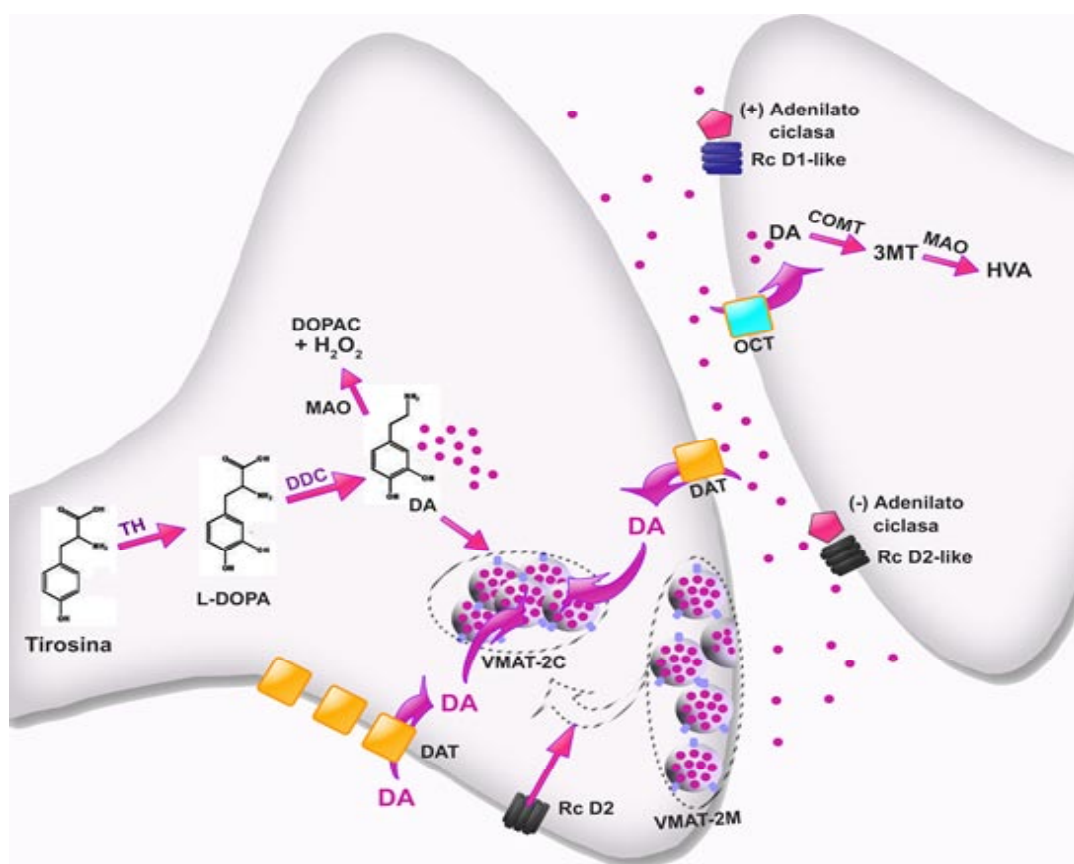


Figura 4. Transmisión dopaminérgica.

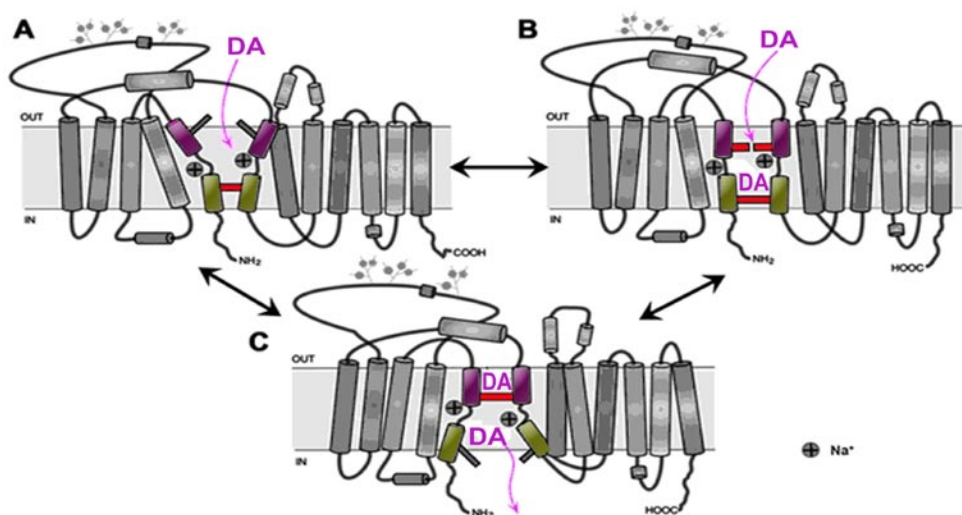
Existen 5 tipos de receptores dopaminérgicos que se dividen según su actividad de adenilciclase en dos familias: la familia D1-like que comprende los receptores D1R y D5R y la familia D2-like que incluye los receptores D2R, D3R y D4R (Yao y cols., 2008). Según una perspectiva funcional, los D1R están presentes de forma predominante en las neuronas estriatales de origen de la vía directa y los D2R se encuentran en las neuronas estriatales de la vía indirecta. Los D2R actúan, además, como auto-receptores ya que se ubican en los terminales dopaminérgicos presinápticos que inervan el estriado y su activación disminuye la liberación de DA local (Kumer y Vrana, 1996). Los D3R, expresados por todas las neuronas dopaminérgicas (Díaz y cols., 2000), son más abundantes en el estriado ventral y en las estructuras del sistema límbico (Sokoloff y cols., 2006). Los receptores D4R abundan en el núcleo caudado y en el estriado ventral y se ubican presinápticamente en las interneuronas estriatales o en las terminaciones corticales (Mrzljak y cols., 1996). Los receptores D5R son más abundantes en la corteza cerebral y se encuentran expresados en menor medida en los ganglios de la base (Ciliax y cols., 2000).

El auto-receptor inhibitorio D2R es presináptico y su activación deriva en una menor liberación de DA (Schmitz y cols., 2001). Además, la activación del D2R potencia la recaptación de DA a través del DAT (Mayfield y Zahniser, 2001) e induce una redistribución vesículas asociadas a membrana (VMAT-2M) hacia la fracción de vesículas citoplasmáticas (VMAT-2C). Las vesículas que contienen el VMAT-2M poseen una cinética de captación de DA de tipo *sigmoidea*, pudiendo captar más DA que una vesícula citoplasmática VMAT-2C, la cual posee una cinética de captación saturable de tipo *Michaelis-Menten* (Volz y cols., 2007b). De este modo, la activación de los D2R implica una mayor captación de DA libre en el citoplasma (Truong y cols., 2004; Volz y cols., 2008).

El DAT se localiza en los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas y en las áreas perisinápticas de los terminales donde actúa recaptando la DA que difunde desde la sinapsis (Torres y cols., 2003). Los transportadores de monoaminas poseen 12 dominios transmembrana (TMDs), numerosos sitios de glicosilación extracelulares y ambos dominios terminales (el amino y el carboxilo) orientados intracelularmente (Hersch y cols., 1997). En el DAT el TMD3 es responsable de la translocación de la DA (Lee y cols., 1998) ya que posee un residuo de fenilalanina (aminoácido aromático) encargado de interaccionar con la porción aromática de la molécula. Por otro lado, el TMD1, al poseer un residuo de ácido aspártico con carga negativa puede interaccionar con las cargas positivas de las monoaminas, participando

del reconocimiento del sustrato. Los transportadores de monoaminas pueden existir como oligómeros, siendo esencial la dimerización del DAT para su movilización y ensamblaje en la superficie celular. Estos transportador es también poseen múltiples sitios de fosforilación que pueden afectar tanto la actividad como la internalización y consecuentemente la disponibilidad del transportador en la membrana celular (Torres y cols., 2003). Finalmente, estos transportadores pueden poseer un patrón de glicosilación variable según la región en la que se expresen, siendo diferente en el estriado dorsal respecto del NAcc (Lew y cols., 1991).

El DAT puede existir principalmente en tres conformaciones de baja energía como se muestra en la **Figura 5**. Los estimulantes interactúan con el DAT ya sea inhibiéndolo competitivamente, como la cocaína, o comportándose como un sustrato del transportador, como las anfetaminas (Schmitt y Reith, 2011, Volz y cols., 2008). Dependiendo del sitio de unión al transportador los “inhibidores clásicos” del DAT, como la cocaína, lo estabilizan en la conformación “abierto hacia afuera” mientras que los “inhibidores atípicos” del DAT lo estabilizan en una conformación cerrada, ya sea en estado “ocluido” o en la conformación de “abierto hacia adentro”. El modafinilo (MOD) ha sido clasificado como un inhibidor atípico del DAT que actúa estabilizando al transportador en una conformación que no permitiría el ingreso de DA ni demás compuestos anfetamínicos sustratos del DAT que interactúan con el sitio S1 de unión a sustrato (Schmitt y Reith 2011; **Figura 5**).



**Figura 5. Ciclo conformacional del DAT (Schmitt y Reith 2011).** (A) Conformación de “abierto hacia afuera” que favorece la unión de los sustratos al sitio S1, (B) La interacción del sustrato con el sitio S1 hace que el transportador adquiera la conformación de “ocluido”. (C) La interacción de una segunda molécula de sustrato con el sitio S2 facilita la apertura de la compuerta intracelular adquiriéndose la conformación de “abierto hacia adentro” del DAT y la liberación de la primera molécula de sustrato del sitio S1 hacia el interior de la célula.

Existen cuatro vías dopaminérgicas centrales. El 80% de las neuronas dopaminérgicas del SNC forman parte de la vía nigroestriatal cuyos somas se encuentran en la SNc y proyectan al estriado dorsal (Joel y Weiner, 2000; Moore y Bloom, 1978). La segunda vía más importante es la mesolímbica, la cual se origina en la VTA e inerva áreas límbicas como el NAcc, la amígdala, el hipocampo y otros núcleos (Moore y Bloom 1978; Swanson, 1982). Esta segunda vía se encuentra involucrada en la motivación, recompensa, y la actividad motora (Le Moal y Simon, 1991). La tercera vía es la mesocortical, encargada de controlar funciones cognitivas y de aprendizaje (Le Moal y Simon, 1991) que también se origina en el VTA pero cuyas terminales alcanzan estructuras corticales (Moore y Bloom, 1978, Swanson 1982). Por último, la cuarta de las vías es la tuberoinfundibular la cual parte del hipotálamo hacia la hipófisis y se encarga de regular funciones neuroendocrinas (Moore y Bloom, 1978).

## C. METANFETAMINA

### I. Acción farmacológica

La metanfetamina (N-metilamfetamina, metilanfetamina o desoxiefedrina), conocida comúnmente como "anfeta", "meta" y "tiza", es una droga de diseño derivada de las anfetaminas que fue desarrollada a comienzos del siglo XX para ser utilizada en descongestivos nasales, inhaladores bronquiales y también para combatir la fatiga y mantener la integridad física de las tropas alemanas durante la segunda guerra mundial (Vearrier y cols., 2012).

En el año 1943, los laboratorios Abbot pidieron la aprobación del uso de la metanfetaina (MET) bajo el nombre de Desoxina a la FDA (Agencia Federal Americana de Drogas) para el tratamiento de la narcolepsia, la depresión, el alcoholismo crónico y la fiebre del heno (Moore ,2011). Si bien inicialmente se dio la aprobación, el uso de MET debió ser discontinuado a causa de su alto poder adictivo y pasó a integrar la lista II de la Convención Internacional de Psicotrópicos (Ley 19.303, Disposición 4855/96).

MET, al igual que otras anfetaminas y otros psicotrópicos de acción simpaticomimética, induce un aumento del estado de alerta y de la actividad motora, un incremento de las capacidades mentales, inhibición del sueño y del hambre y una disminución de la fatiga junto con la elevación del estado de ánimo o euforia (Schep y cols., 2010). Se trata de una base débil que a pH fisiológico se encuentra predominantemente cargada de forma positiva e

ingresa al terminal dopaminérgico principalmente a través del DAT (Volz y cols., 2008). Una vez dentro del terminal, MET se une al transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) e ingresa a las vesículas sinápticas, altera el gradiente de protones e induce el desplazamiento de las moléculas de DA almacenadas en la vesícula hacia el citosol (Sulzer y cols., 2005). MET no sólo induce un aumento de DA en el citosol sino que además revierte la dirección de transporte de DA a través del DAT, produciéndose la liberación de DA hacia la hendidura sináptica en lugar de su recaptación (Sulzer y cols., 2005). Por último, MET también produce una inhibición sobre la MAO lo que contribuye a que haya más DA disponible para ser liberada debido a su menor metabolización (Sulzer y cols., 2005).

## II. Formas de consumo

MET es un polvo blanco, cristalino, sin olor y con sabor amargo que se disuelve fácilmente en agua y cuya forma más común de consumo es la vía intranasal. No obstante, MET también puede ser ingerida, inhalada, fumada, inyectada o administrada por vía anal cuando los fines de su uso son recreacionales (Cho y Melega, 2002; Schep y cols., 2010). MET atraviesa rápidamente la BHE debido a su alta lipofilicidad. MET puede consumirse en su forma dextrógira (D-MET), levógira (L-MET) con un efecto estimulante cuatro veces menor o como una mezcla racémica de ambos isómeros (DL-MET) obtenida principalmente a partir de la síntesis ilegal (Mendelson y cols., 2008, Schep y cols., 2010).

Se denomina "cristal" a MET en forma de base libre (clorhidrato de D-metanfetamina), usualmente fumada debido a su rápida absorción. La dosis usual de MET cristal se estima en 100 mg/día (Mejía y Solórzano, 1995) y su vida media es de aproximadamente 12 horas (Schepers y cols., 2003). Los efectos de su consumo son inmediatos, como la sensación de "rush" o "flush" descrita como una sensación extremadamente placentera de pocos minutos de duración que se continúa con una sensación de euforia (Beauvais y cols., 2012). MET, al igual que otros estimulantes, es abusada durante ciclos de "uso fuerte y desplome" (*binge and crash*) con la intención de mantener la sensación de euforia por más tiempo, ya que los efectos placenteros desaparecen antes de que disminuyan significativamente los niveles de la droga en sangre (U.S. DHHS NIDA, 2013).

Finalmente, MET es metabolizada en el hígado por hidroxilación aromática y demetilación y de su metabolismo se obtiene anfetamina (ANF) como metabolito activo (Cook y cols., 1992; Lin y cols., 1997).

### III. Efectos Secundarios

La principal razón por la cual MET es consumida es debido al estado de euforia y alerta que la droga produce. Sin embargo, son muchos los efectos secundarios negativos que acompañan al consumo de MET como la taquicardia, la hipertensión arterial, la hipertermia, la taquipnea, la vasoconstricción y la arritmia cardíaca (Maxwell, 2005), siendo la hiperpirexia o "golpe de calor" una de las más serias complicaciones del uso de MET.

La ingesta de dosis tóxicas de MET puede producir agitación, ansiedad, alucinaciones y *delirium* (síndrome confusional agudo). La sobredosis de de MET puede derivar en un estado de coma irreversible o muerte. La intoxicación crónica, por otro lado, puede desencadenar un estado de paranoia psicótico con delirios que pueden resultar en actos de violencia y agresión (Maxwell, 2005; McKetin, 2013).

Se ha descrito previamente que MET es una droga de abuso tóxica para los terminales dopaminérgicos y serotoninérgicos (Hotchkiss y cols., 1980, Woolverton y cols., 1989). En los adictos crónicos, pueden observarse alteraciones en las funciones cerebrales que perduran aun después de largos periodos de abstinencia y efectos deletéreos sobre procesos cognitivos como la memoria y la atención (Nordahl y cols., 2003).

El abuso extendido de MET genera tolerancia, dependencia y/o adicción. La adicción es una enfermedad crónica con recaídas que se caracteriza por la búsqueda y uso compulsivo de la droga y que se acompaña de cambios funcionales a nivel central. Junto con la tolerancia a los efectos placenteros puede ocurrir que algunas personas se vuelvan sensibles a otros efectos de la droga, fenómeno conocido como tolerancia reversa (Itzhak y cols., 2002). El uso crónico de MET genera dependencia psicológica lo que se evidencia en el uso compulsivo de la droga, un deseo incontrolable de consumirla durante su abstinencia (*craving*) y la inhabilidad de suspender su consumo. Se cree que estas alteraciones son consecuencia de cambios sinápticos plásticos a nivel de las terminales monoaminérgicas (Barr y cols., 2006; Kish, 2008).

### IV. Abordaje Terapéutico

Hoy en día, los tratamientos más eficaces contra la adicción a MET son las terapias conductuales combinadas con la educación familiar, terapias individuales, apoyo a través de un programa de 12 pasos, pruebas para detectar el uso de drogas y fomentar el desarrollo de actividades no relacionadas a las drogas (U.S. DHHS NIDA 2013).



Actualmente, no existen fármacos aprobados específicamente para contrarrestar los efectos de la abstinencia a MET y que a su vez sean capaces de reducir el abuso a esta droga. No obstante, varios medicamentos que han sido aprobados por la FDA para otras enfermedades, como el bupropión y MOD, están siendo estudiados actualmente en ensayos preclínicos para el tratamiento de la adicción a MET.

## D. MODAFINILO

### I. Acción farmacológica

Desde su aprobación como agente anti-narcoléptico, MOD es comercializado bajo el nombre comercial de Modiodal® (Europa) y Provigil® (EEUU). Se vende bajo receta archivada y se encuentra clasificado como psicoestimulante aún cuando sus efectos conductuales y fisiológicos difieren de los producidos por los estimulantes tradicionales pertenecientes a esta categoría (**Tabla 3**).

	Anfetaminas	MOD
Duración de la acción	Corta	Larga
Especificidad de la acción	Baja	Alta
Dependencia	Riesgo moderado	Bajo riesgo
Síntomas de abstinencia	Comunes	Ausentes
Tolerancia	30% narcolépticos	No reportada
Efectos adversos	Múltiples	Pocos o leves.
Contraindicaciones	Múltiples	Escasas
Interacciones	Ocasionales	Raras
Efectos de sobredosis	Severos, fatales	Insomnio

**Tabla 3. Comparación entre los efectos producidos por MOD y las anfetaminas.**

Se han propuesto diversos mecanismos de acción de MOD y actualmente es objeto de estudio la acción de esta droga sobre los distintos sistemas de neurotransmisión y/o neuromodulación. Entre sus efectos se ha descrito un aumento de la actividad de los sistemas adrenérgico, glutamatérgico e hipocretinérgico junto con una disminución de la actividad del sistema gabaérgico en áreas específicas del cerebro (Ballon y Feifel, 2006). También, se ha descrito un aumento de la liberación de histamina en el hipotálamo, el aumento del acoplamiento eléctrico entre interneuronas de la corteza y neuronas de la oliva inferior (Urbano y cols., 2007) y varias áreas involucradas en el sistema de activación reticular del tronco del encéfalo que regula el ciclo de sueño/vigilia (García-Rill y cols., 2007). Entre los

efectos descritos de MOD, el blanco de acción más relevante para nuestro trabajo es el bloqueo del DAT, evidenciado tanto in vitro ( $IC_{50}=3-5 \mu M$ , Mignot y cols., 1994; Zolkowska y cols., 2009) como in vivo (Volkow y cols., 2009). Asimismo, MOD también parecería actuar a través de los D2R como agonista parcial de los mismos (Korotkova y cols., 2007, Qu y cols., 2008, Seeman y cols., 2009).

## II. Farmacocinética

MOD es un compuesto racémico prácticamente insoluble en agua que se consume de forma oral y cuyo pico plasmático se alcanza entre las 2 y las 4 horas posteriores a su ingesta. La vida media en humanos es de aproximadamente 12-15 horas y su metabolismo ocurre a nivel hepático por deaminación, oxidación del grupo sulfhidrilo, hidrólisis del grupo aromático y glucuronidación con eliminación renal de los metabolitos obtenidos (Robertson y Hellriege, 2003).

## III. Efectos Secundarios

Si bien MOD es generalmente bien tolerado, los efectos secundarios comúnmente reportados a dosis prescritas son: cefaleas, náuseas, vómitos de intensidad leve a moderada, nerviosismo, intranquilidad e insomnio que pueden ser minimizados si el fármaco se administra por la mañana. Asimismo, a dosis mayores a 600 mg/día puede inducir efectos cardiovasculares en algunos pacientes siendo los más frecuentes la hipertensión y aumento de la frecuencia cardíaca (Robertson y Hellriegel, 2003).

En comparación con otros estimulantes del SNC, la incidencia de efectos adversos en pacientes narcolépticos es menor cuando el tratamiento se realiza con MOD. Más aún, MOD no induce tolerancia ya que ha demostrado mantener su eficacia en tratamientos prolongados de hasta 10 años de duración (Kumar, 2008). Discontinuar el tratamiento no desencadena un síndrome de abstinencia como lo hace el consumo crónico de anfetaminas (Jasinski y Kovacevic-Ristanovic, 2000). Además, el potencial de abuso de MOD es limitado (Myrick y cols., 2004), dato que no resulta menor si se tiene en cuenta que MOD incrementa los niveles extracelulares de DA en el NAcc (Volkow y cols., 2009), área que forma parte del circuito de recompensa y participa en el desarrollo de las adicciones.

#### IV. Usos terapéuticos

MOD es considerado por la Federación Europea de Sociedades Neurológicas (EFNS) y la FDA como el neuroestimulante de primera elección para el tratamiento de somnolencia diurna excesiva asociada a la narcolepsia (Bastuji y Jouvet, 1988; Green y Stillman 1998), a la apnea obstructiva del sueño (Black y Hirschkowitz, 2005) y a desordenes del sueño por cambio de turno de trabajo (shift work disorder; Czeisler y cols., 2005). Además, MOD ha demostrado ser efectivo para mejorar funciones cognitivas como la atención, la memoria de trabajo y la concentración (Minzenberg y Carter, 2008). Actualmente, en Argentina, MOD es conocido como "la píldora universitaria" debido a que es consumido por estudiantes universitarios con el fin de incrementar la capacidad de concentración y mantenerse despiertos con el propósito de mejorar el rendimiento académico (Galván, 2008). De este modo, no sólo se hace uso de la propiedad antinarcotéptica de este fármaco, sino también de su propiedad de mejorador cognitivo (Turner y cols., 2004a y 2004b).

Fuera de los usos aprobados, MOD es utilizado como monoterapia farmacológica para el tratamiento de dependencia a sustancias y a veces asociado a terapias cognitivas de comportamiento. MOD ha probado ser efectivo para disminuir el uso de cocaína, aumentar el periodo de abstinencia y disminuir el número de recaídas en adictos (Dackis y cols., 2005; Hart y cols., 2008). Más aún, MOD logró aumentar el número de días en los que los pacientes con dependencia a MET permanecen sin consumirla (Anderson y cols., 2009, Shearer y cols., 2009), resultó ser efectivo para incrementar el desempeño cognitivo (Kalechstein y cols., 2010) y disminuir los síntomas de abstinencia en adictos (McGregor y cols., 2008).

#### D. HIPÓTESIS DE TRABAJO

A partir de lo expuesto anteriormente y sumado al hecho de que Por ultimo, MOD mostró tener propiedades neuroprotectoras frente al daño dopaminérgico de la vía nigroestriatal inducido por la administración de la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP; Van Vliet y cols., 2008) en un modelo de Parkinson, se desprende la siguiente hipótesis de trabajo: "Si el uso de MOD puede prevenir frente al daño dopaminérgico inducido por MPTP en un modelo preclínico de la enfermedad de Parkinson y, el consumo de MET resulta tóxico para los terminales dopaminérgicos, entonces MOD podría neuroproteger frente al daño de los terminales dopaminérgicos que inervan el estriado inducido por MET".

La relevancia de este trabajo radica en el potencial uso de MOD en las distintas fases del tratamiento de personas adictas a MET. MOD actualmente es utilizado como terapia de reemplazo en adictos a MET que atraviesan periodos de abstinencia haciendo uso de su efecto estimulante de larga duración. MOD también resulta útil en el tratamiento de pacientes adictos a MET con deterioro cognitivo debido a sus propiedades de mejorador cognitivo. Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en esta tesis se desprende que MOD también sería útil en fases iniciales del tratamiento, cuando el paciente aún no ha abandonado por completo el uso de MET, debido a su capacidad neuroprotectora frente al daño neuronal inducido por MET.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de investigación es evaluar el efecto neuroprotector de MOD sobre la toxicidad inducida por MET en el estriado en un modelo de ratón. Las conclusiones de este trabajo podrían aportar datos experimentales que contribuyan a aclarar el mecanismo de acción de MOD, cuya propiedad como estimulante/mejorador cognitivo podría resultar benéfica en el tratamiento de adicciones a estimulantes y otras patologías que involucren alteraciones dopaminérgicas, como la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia.

### Objetivos específicos

1. Evaluación de la capacidad neuroprotectora de modafinilo sobre la neurotoxicidad inducida por la administración aguda de metanfetamina en ratones macho. Evaluar si la administración de MOD es capaz de proteger las terminales de las neuronas dopaminérgicas que inervan el estriado de los efectos perjudiciales de MET y si la coadministración de ambos estimulantes ocasiona efectos no deseados.
2. Corroborar que la capacidad neuroprotectora de MOD frente a la neurotoxicidad inducida por MET se mantenga en ratones hembra.
3. Estudio del efecto de modafinilo sobre la activación de genes de expresión temprana, la activación de las células de la glía y la expresión de genes relacionados con la apoptosis mediada por metanfetamina.
4. Análisis del rol de la regulación de la temperatura corporal en el mecanismo de acción neuroprotector de MOD sobre la neurotoxicidad inducida por MET.

---

# CAPÍTULO I

---

## A. INTRODUCCIÓN

### **Objetivo específico I: Evaluación de la capacidad neuroprotectora de modafinilo sobre la neurotoxicidad inducida por la administración aguda de metanfetamina en ratones macho.**

El consumo de MET induce cambios en el cerebro tanto en áreas involucradas en funciones cognitivas como en áreas que forman parte del sistema de recompensa (sistema mesolímbico). Estos cambios contribuyen al deseo de consumir la droga, al desarrollo de déficits cognitivos y a la expresión de síntomas motores observados con frecuencia en pacientes adictos a MET (Davidson y cols., 2001; Panenka y cols., 2012).

El cuerpo estriado se encarga de regular el tono muscular y los movimientos de tipo inconscientes (ej. balanceo de brazos al andar) o automáticos que requieren de un aprendizaje previo (ej. andar en bicicleta). Desbalances entre la vía dopaminérgica directa y la indirecta derivan en síndromes hipocinéticos como los observados en la enfermedad de Parkinson y la de Huntington (Albin y cols., 1989, Wichmann y cols., 1998). Los psicoestimulantes, entre ellos las anfetaminas, pueden inducir estereotipias tanto en humanos (denominadas *pudding*) como en animales de experimentación al ser administradas en dosis altas o de forma repetida (Atkins y cols., 2001, Schiorring, 1981). Las estereotipias son definidas como el desarrollo anormal de acciones repetitivas que coinciden con la imposibilidad de iniciar respuestas de tipo adaptativas (Canales y Graybiel, 2000) y pueden ser observadas en una amplia variedad de desordenes psiquiátricos y neurológicos como la esquizofrenia y desórdenes de tipo obsesivo compulsivo (Ridley, 1994).

A su vez, el consumo repetido o de altas dosis de MET puede derivar en un menor contenido de DA estriatal (Cadet y cols., 1994, Fantegrossi y cols., 2008) y en el daño a las neuronas dopaminérgicas (Krasnova y Cadet, 2009; Ricaurte y cols., 1984). Este daño es evidenciado por la disminución de la expresión de marcadores de integridad de terminales dopaminérgicas en el estriado, como TH, DAT y VMAT-2 (Achat-Mendes y cols., 2005; Harvey y cols., 2000; y O'Callaghan y Miller, 1994). La vía nigroestriatal es particularmente vulnerable a los efectos deletéreos de MET (Kuhn y cols., 2011) y la degeneración de fibras dopaminérgicas observada en el estriado se produce independientemente de la pérdida de cuerpos neuronales en la sustancia nigra (Harvey y cols., 2000, Ricaurte y cols., 1984). Sin embargo, se ha evidenciado pérdida neuronal en estudios postmortem (Wilson y cols., 1996).

La principal consecuencia del ingreso de MET a la célula es el desplazamiento de DA desde las vesículas al citoplasma (Krasnova y Cadet, 2009). Junto con el incremento citoplasmático de DA se produce la saturación de la MAO y su inhibición por parte de MET (Seiden y cols., 1993a) lo que lleva a la metabolización de DA libre por vías no enzimáticas. La oxidación de DA deriva en la producción de sustancias potencialmente tóxicas como los radicales libres del oxígeno, el peróxido de hidrógeno y las quinonas de DA que se unen a los grupos cisteinil de las proteínas (LaVoie, 1999). MET también estimula la peroxidación lipídica (Gluck y cols., 2001, Jayanthi y cols., 1998) y estos compuestos dañan a las membranas y al ADN, causan disfunción mitocondrial e inducen la apoptosis. Todos estos procesos en conjunto producen finalmente el daño de los terminales dopaminérgicos (Thomas y cols., 2008).

Paralelamente al incremento citoplasmático de la DA libre, MET invierte la dirección de transporte del DAT. En consecuencia la DA citoplasmática es liberada al espacio sináptico alcanzando niveles dramáticamente altos relacionados directamente con el efecto reforzante de MET y sus efectos tóxicos (Sulzer, 2005). MET también induce una liberación de glutamato en el estriado a través de la estimulación dopaminérgica de la vía directa (Mark y cols., 2004) el cual activa los receptores NMDA permitiendo el ingreso de calcio al interior de la célula. El calcio libre intracelular en cantidades excesivas puede desencadenar la toxicidad y el daño neuronal (Gunasekar y cols., 1995, Lafon-Cazal y cols., 1993)

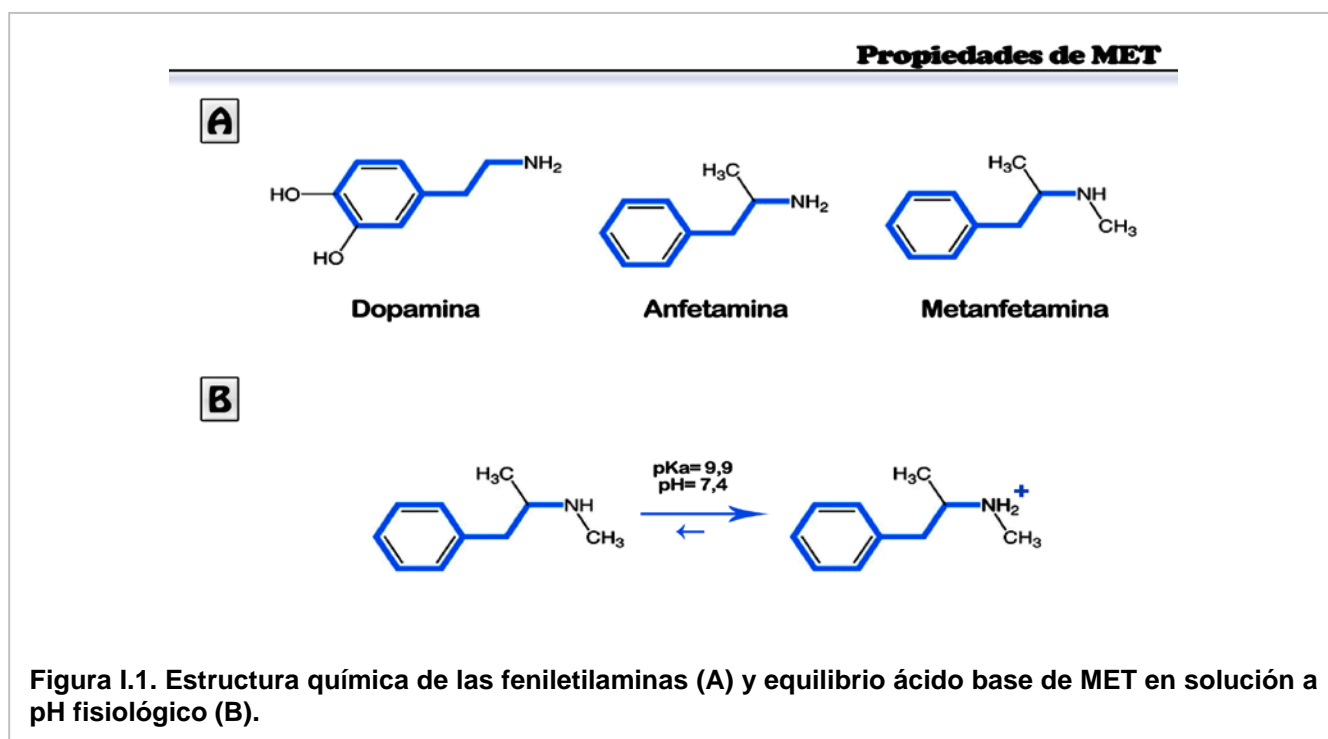
MOD, a diferencia de MET, es un neuroestimulante aprobado por la FDA para el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva. Más allá de este uso para el cual fue aprobado específicamente, MOD es actualmente utilizado para el tratamiento de la dependencia a psicoestimulantes como cocaína y MET (Ballon y Feifel, 2006).

En lo que respecta al mecanismo de acción de MOD, el mismo parecería involucrar cambios en múltiples sistemas de neurotransmisión. En un estudio realizado con MOD en humanos mediante la técnica de tomografía de emisión de positrones (PET), se observó el bloqueo del DAT y el consecuente aumento de DA extracelular en áreas cerebrales como el NAcc (Volkow y cols., 2009). De forma análoga, Zolkowska y cols., (2009) demostraron que MOD se une e inhibe moderadamente la recaptación de DA a través del DAT en sinaptosomas de rata. A su vez, y a pesar de ser un estimulante que induce un aumento de DA extracelular, el mecanismo de acción de MOD parecería ser diferente al de los compuestos de tipo anfetamínicos ya que su potencial de abuso y su capacidad de inducir dependencia sería mucho



menor que el producido por este tipo de estimulantes (Myrick y cols., 2004). No obstante, se debe tener especial cuidado en personas vulnerables ya que su mecanismo de acción también involucra la DA y consecuentemente impacta sobre el sistema de recompensa del cerebro.

Finalmente, cabe agregar que MOD ha mostrado ser neuroprotector en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson inducido con MPTP (Van Vliet y cols., 2008). El MPTP atraviesa la BHE y es convertido por la MAO-B en el ion MPP<sup>+</sup>, el cual precisa del DAT para ingresar a la célula ya que no puede difundir a través de la membrana por tratarse de una molécula cargada (Bezard y cols., 1999). MET, a diferencia del MPTP, es una feniletilamina (al igual que la DA y la ANF, **Figura I.1**) que posee un grupo metilo unido al grupo amino. Este metilo hace que MET sea más lipofílica que la anfetamina [Log p (MET)= 2,07; Log p (ANF)= 1,76; Gulaboski y cols., 2007] y que atraviese más rápidamente la BHE (Barr y cols., 2006). Una vez que alcanza el SNC, esta base débil (pKa=9,9, Hansch y cols., 1995), cuyo equilibrio a pH fisiológico se encuentra desplazado hacia la forma cargada positivamente (Volz, 2008) ingresa al terminal dopaminérgico (Davidson y cols., 2001). Si bien MET también puede difundir pasivamente por la membrana plasmática e ingresar a la célula, el uso del DAT sería necesario para que MET ejerza su efecto neurotóxico probablemente a causa de la inversión de la dirección de transporte de DA. Este hecho fue evidenciado en estriados de ratones con el gen para DAT deletado ya que luego de la administración de un protocolo tóxico de MET no se observó ni una depleción de los niveles de DA ni la producción de radicales libres (Fumagalli y cols., 1998).



Asimismo, muchos bloqueantes del DAT han resultado ser efectivos para prevenir los cambios neurotóxicos inducidos por MET (Marek y cols., 1990; Sandoval y cols., 2003). Es debido a las propiedades neuroprotectoras de MOD frente al daño dopaminérgico inducido por MPTP sumada a la evidencia de que MOD es capaz de bloquear el DAT que en el presente capítulo nos propusimos *evaluar el posible rol protector de MOD frente a la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por MET en ratones.*

## B. METODOLOGÍA

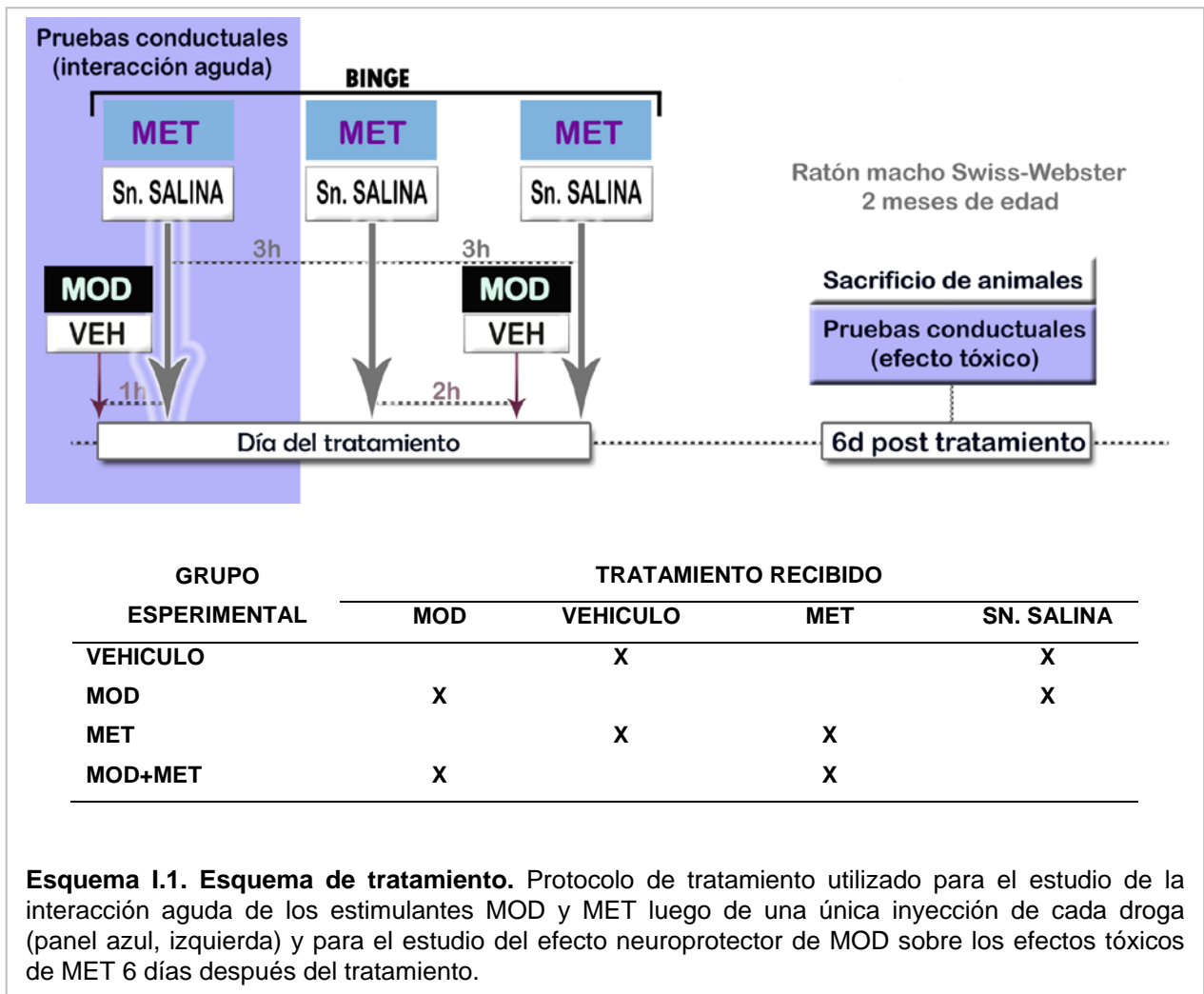
### I. Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa Swiss-Webster (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires), de 8 semanas de edad (18-23g de peso) al inicio de los procedimientos experimentales. Se agruparon de a 4-5 animales por jaula con libre acceso al agua y la comida, en una sala con temperatura ( $20 \pm 2^\circ \text{C}$ ) y humedad relativa ( $55 \pm 15\%$ ) controladas y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas de acuerdo con las regulaciones locales (SENASA, Argentina). Todos los procedimientos que involucraran el uso de animales se realizaron conforme a la Guía para el Cuidado y el uso de los Animales de Laboratorio (National Institute of Health, NIH, USA).

### II. Protocolo de administración de drogas.

Para los experimentos iniciales enfocados en el estudio del efecto estimulante de MET y MOD se probaron dos dosis distintas de MET (2 y 7 mg/kg) y dos dosis de MOD (90 y 180 mg/kg). MOD fue administrado 1 hora previa a la administración de MET y fue disuelto en una solución de DMSO 5% en solución salina (solución vehículo). El volumen total de inyección fue de 200ul por animal. MET fue disuelta en solución salina.

En roedores la vida media de MET es más corta que en humanos (aproximadamente 1h en ratones, Brien y cols., 1978 y 12 horas en humanos, Cho y cols., 2001). Para el estudio del efecto neuroprotector de MOD se utilizó un protocolo de administración repetida de MET, también denominado "*binge*" (3 x 7 mg/kg, cada 3 horas, i.p.) el cual fue elegido en base a lo reportado previamente por Achat-Mendes y cols. (2005). Estos autores observaron alteraciones estriatales en marcadores dopaminérgicos luego de un *binge* de MET. La vida media de MOD en roedores es de aproximadamente 1 hora (Dawson y cols., 2012) y por ello fue administrado en dos ocasiones, 1 hora antes de la primera inyección de MET y 1 hora antes de la última inyección de MET como se muestra en el **Esquema I.1**.



### III. Respuesta locomotora en campo abierto

Se determinó la distancia total recorrida (en intervalos de 5 minutos) a partir de los 30 minutos previos a la administración de MET y durante los 120 minutos posteriores a la misma, habiéndose administrado MOD previamente (60 minutos antes que MET). Para el registro de la actividad locomotora se utilizaron cajas plásticas de 19 x 40 x 40 (en cm) y el software Ethovision XT 5.1 (Noldus) para la adquisición y el análisis de los videos obtenidos.

Para el caso de la actividad locomotora espontánea se registró la distancia recorrida por los animales a los 6 días posteriores al tratamiento con el *binge* de MET y/o MOD durante un periodo de 30 minutos, dentro de los cuales los primeros 10 minutos se consideran conducta exploratoria y fueron los utilizados para realizar la cuantificación.

#### IV. Análisis de conductas estereotipada

A partir de los videos obtenidos al momento de registrar la actividad locomotora aguda se procedió a cuantificar las estereotipias mediante una versión modificada de la escala de estereotipias de Creese e Iversen (1974). Se evaluó la conducta de cada animal durante períodos de 10 segundos (separados en intervalos de 50 segundos) por un total de 2 horas atribuyéndole un valor a cada intervalo según: 0, inmovilidad, 1, ambulaciones, 2, olfateo discontinuo, 3, erguido en sus patas traseras, 4, olfateo continuo, 5, acicalamiento energético. Las conductas correspondientes a los valores 0-3 se consideran conductas exploratorias y locomotoras mientras que las últimas dos categorías (4-5) se consideran conductas estereotipadas. Se calculó la frecuencia relativa de cada estereotipia sobre el número de observaciones realizadas en las 2 horas posteriores a la inyección de MET.

#### V. Determinación de catecolaminas por HPLC

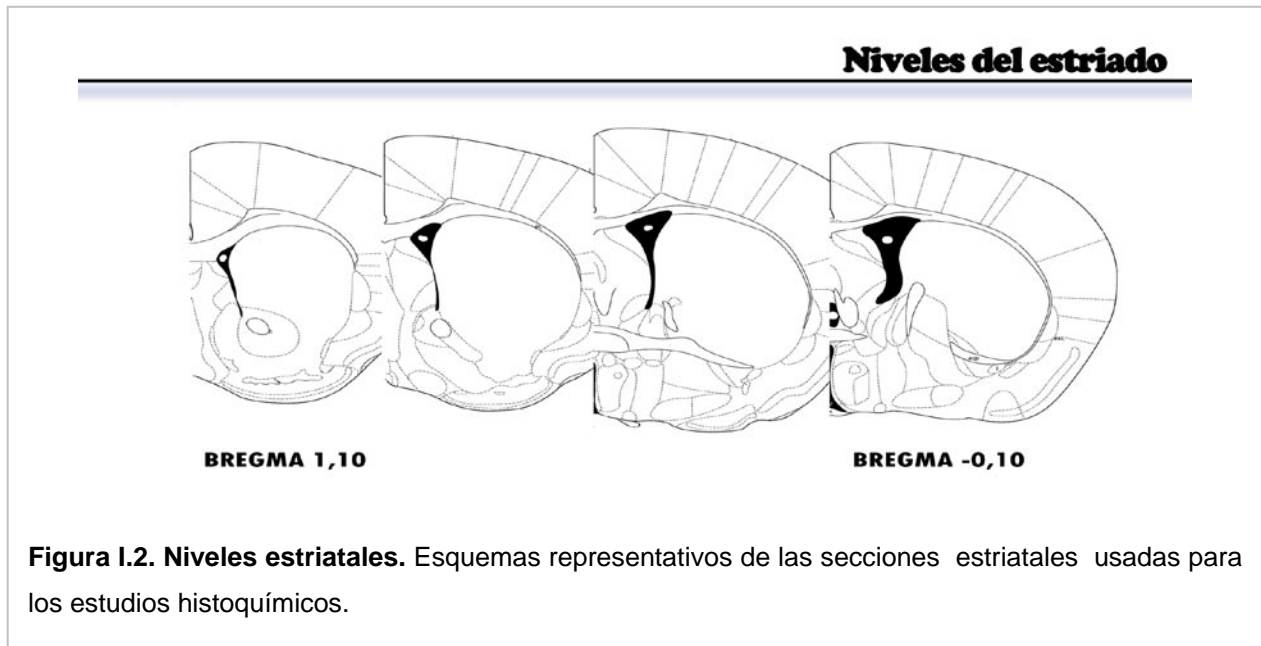
La disminución estriatal de DA inducida por MET es uno de los cambios neuroquímicos más característicos descritos luego de la administración de un tratamiento tóxico con MET (Davidson y cols., 2001). En este trabajo, se determinaron los niveles de catecolaminas mediante el uso de la técnica de HPLC con detección electroquímica para DA, DOPAC y HVA con un cromatógrafo Varian 5000 acoplado a un detector electroquímico (BAS LC-4C, seteado a un potencial de 0,7V). Después de 6 días de la administración de los tratamientos se procedió a la disección de los estriados de los animales tratados que fueron preservados a -70° C. El mismo día de la determinación de las catecolaminas los tejidos fueron homogeneizados en ácido perclórico 0.2 N (1/20 p/v), centrifugados y luego los sobrenadantes fueron inyectados (loop 50 µl) en una columna de fase reversa de carbono 18 (12.5 cm x 4 mm, Nova-Pak, Waters). Se utilizó como fase móvil una solución de 0.076 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5.24 ml/L PICB8, 0.99mM EDTA, 6% metanol) y un flujo de bombeo de 1.3 ml/min.

#### VI. Inmunohistoquímica

##### a. Obtención y procesamiento del tejido

Cada animal fue anestesiado con ketamina (0,5 ml/kg i.p, Holliday-Scott) y xilazina (1,4 ml/kg i.p., Kensol-König) y perfundido intracardiamente con 20 ml de buffer fosfato salino (PBS) 10mM heparinizado (pH 7,4, Heparina sódica 1000UI/L) seguido de 80 ml de paraformaldehído (PFA) 4% en buffer fosfato (PB) 0,1M (pH 7.4). Luego de ser extraídos, los cerebros fueron fijados en PFA a 4°C por 16 horas. Los tejidos se criopreservaron en

sacarosa 30% PB 0,1M durante 48 horas y luego se obtuvieron secciones seriadas de 30  $\mu\text{m}$  de espesor con un micrótopo de congelamiento a nivel del Estriado (+1.10 a -0.10 mm relativo al Bregma, Atlas de Cerebro de Ratón, Paxinos y Franklin 2001). Se analizaron 4 secciones coronales representativas del estriado para cada animal, separadas cada 150 $\mu\text{m}$  entre ellas para cada uno de los marcadores como se muestra en la **Figura I.2.**



**Figura I.2. Niveles estriatales.** Esquemas representativos de las secciones estriatales usadas para los estudios histoquímicos.

#### **b. Inmunohistoquímica colorimétrica para tirosina hidroxilasa (TH)**

Con el fin de establecer el grado de alteración en los terminales dopaminérgicos se realizó la detección inmunohistoquímica de TH, enzima limitante en la síntesis de DA.

El marcado para TH se realizó en cortes en suspensión *"free floating"* (Raineri y cols., 2011). Durante todo el procedimiento se utilizó para la preparación de los reactivos y la realización de los lavados PBS 0,1M con Tritón X-100 al 0,1% (PBS-T 0,1%). Inicialmente, las secciones fueron permeabilizadas durante 30 minutos con el objeto de facilitar el ingreso a las células de los reactivos. Luego, las mismas fueron incubadas durante 30 minutos en una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,6% para inhibir peroxidasas endógenas y posteriormente se procedió al bloqueo de los sitios de unión inespecífica al anticuerpo secundario con suero normal de cabra 2% (NGS). Los cortes permanecieron por 16 horas a 4°C en agitación en una solución de anticuerpo anti-TH producido en conejo (1:1000, Pel Freeze Biologicals, USA). Luego de ser lavados, los cortes fueron incubados durante 2 horas con una solución conteniendo el anticuerpo secundario anti-conejo unido a biotina

producido en cabra (1:500, Sigma Aldrich, USA). En una última incubación se utilizó el complejo avidina-biotina (1:125, Vectastain, ELITE ABC kit, Vector Laboratories) para amplificar la señal por 2 horas y finalmente se procedió al revelado colorimétrico utilizando diaminobencidina (DAB) 0.5 mg/ml (Sigma Aldrich, USA) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.015% como sustratos de la peroxidasa. Las secciones fueron lavadas y montadas en portaobjetos gelatinizados, secadas y deshidratadas mediante pasajes sucesivos por soluciones decrecientes de etanol (70, 96 y 100%) y, en última instancia, los portaobjetos fueron aclarados en xileno 100% y cubiertos con un medio de montaje a base de xileno.

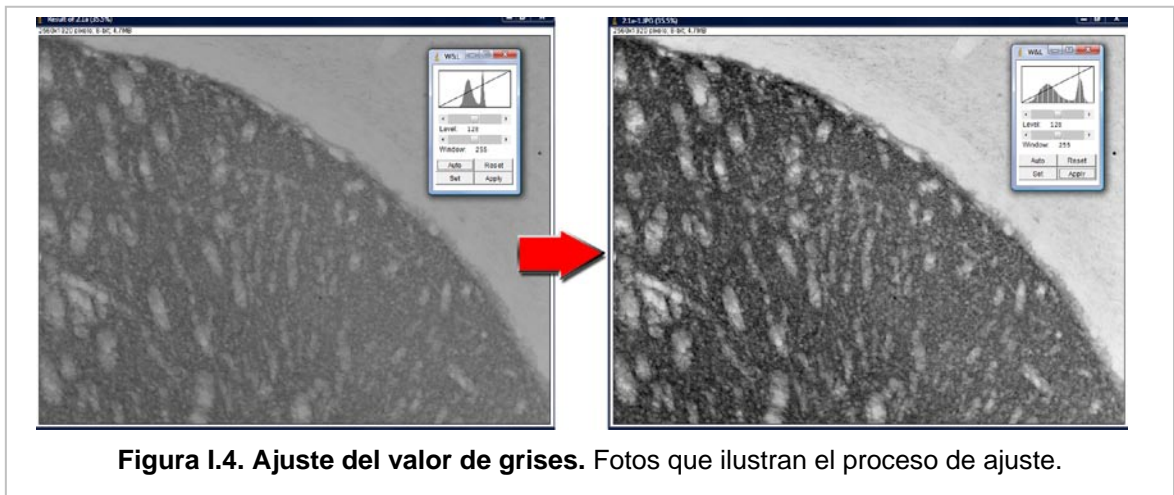
### c. Cuantificación de la densidad óptica integrada

La integridad del sistema dopaminérgico a nivel del estriado se evaluó mediante la densidad óptica integrada (DOI) en las secciones inmunomarcadas para TH como se muestra en la **Figura I.2**. Se tomaron fotos con un objetivo 10x de cada nivel anatómico y para cada una de las áreas estriatales a estudiar (StLd y NAcc) con una resolución de 255 niveles de grises/píxel con un microscopio Nikon (Eclipse 50i) conectado a una cámara CCD. La medición de la DOI se realizó empleando las herramientas del programa de procesamiento y análisis de Imágenes Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>, NIH, USA) de forma automatizada mediante al uso de macros a modo de minimizar el sesgo que pueda introducir el operador (ver apéndice I). La secuencia de pasos fue la siguiente:

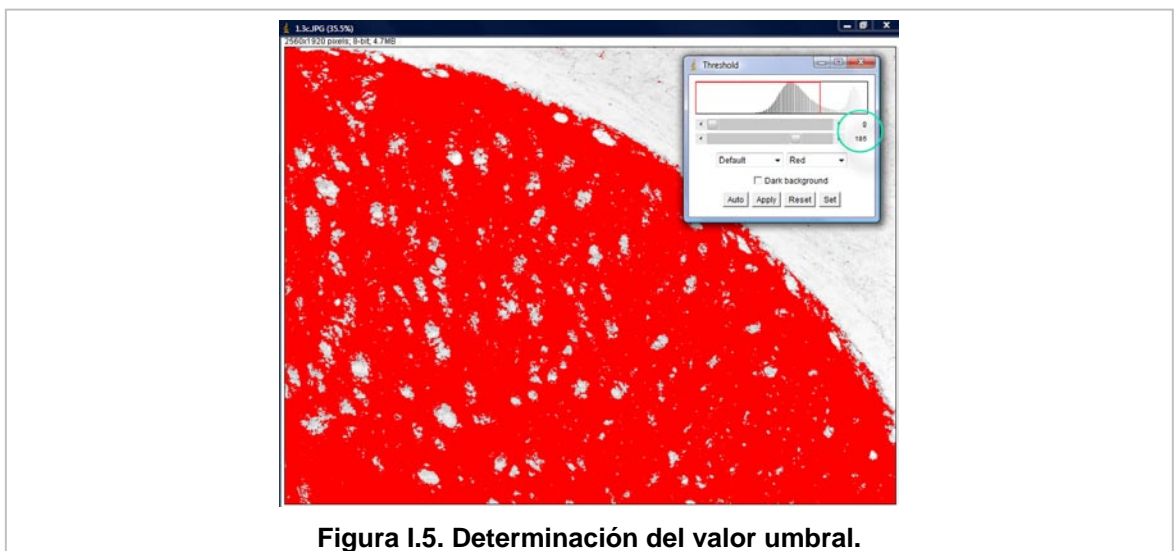
- i. Corrección de la iluminación: Debido a que la luz que ilumina el portaobjetos dispersa menos en el centro del campo respecto de los bordes se procedió a corregir esta iluminación no homogénea creando una imagen de la distribución de la luz con el plug in "a posteriori shading correction" (NIH ImageJ) de una foto tomada en un sector del portaobjeto sin tejido. Luego, a cada una de las fotos tomadas se le restó la foto de la iluminación ahora denominada 'Background' (**Figura I.3**).



- ii. Ajuste de la escala de densidad óptica: Con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la medición nos propusimos ajustar la escala de grises de las fotos de forma tal que el mínimo valor de grises presente en todas las fotos sea el cero de la escala y que el máximo valor de grises de la foto más oscura sea 255. Para lograr esto, se midieron todas las fotos y con los valores de máximo y mínimo de grises de cada una de las fotos se calculó el mínimo valor de gris y el máximo valor de gris de entre todas las fotos y con estos valores se realizó el ajuste (**Figura I.4**).

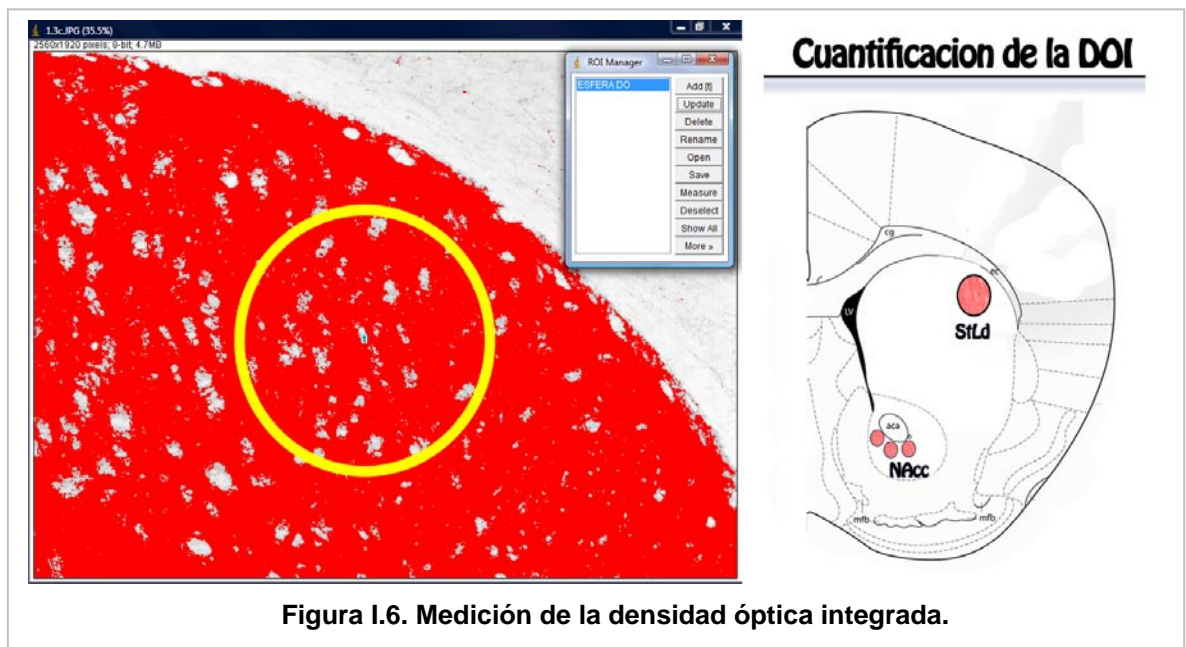


- iii. Determinación del valor umbral de densidad óptica a utilizar: Se le adjudicó un valor umbral de densidad óptica a cada animal del grupo vehículo (control) tal que todo valor de intensidad que supere el umbral sea considerado marca específica y se realizó un promedio de todos ellos. Ese valor promedio fue luego utilizado para la cuantificación final de todas las fotos de todos los grupos (**Figura I.5**).





iv. Medición de la DOI: Se eligió medir la DOI ya que al tratarse del producto de la densidad óptica por el área inmuno reactiva, la misma resulta más sensible para detectar diferencias con el tratamiento con MET (**Figura I.6**, panel izquierdo). Luego de aplicado el umbral de densidad óptica y mediante la herramienta de selección de la región de interés a medir (ROI) del software se determinó la DOI en una elipse de  $151.1\mu\text{m}^2$  en el estriado dorsal lateral (StLd) y en tres elipses de  $14.1\mu\text{m}^2$  ubicadas en el Núcleo Acumbens core (NAcc) como se muestra en la **Figura I.6**, panel derecho. Se eligió el StLd en base al trabajo de Boger y cols. (2007) en el que se evidenció una mayor disminución de la marca en este sector comparado con el estriado dorsal medial.



**Figura I.6. Medición de la densidad óptica integrada.**

## VII. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico InfoStat versión 2013 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>). En todos los casos se consideraron significativas las diferencias con un valor de  $p < 0,05$ . Para el análisis de los datos se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis siempre que la variable no siguiera una distribución normal y en aquellos casos en los que la variable no cumpliera con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. En caso de cumplirse los supuestos usamos ANOVA de un factor seguido de la prueba de la mínima diferencia significativa de Fischer (LSD) cuando los grupos fueran balanceados o Tukey-Cramer para los casos en los que el número de animales entre los grupos de tratamiento estuviera desbalanceado.

## C. RESULTADOS

Para determinar el patrón conductual emergente de la interacción aguda de MOD y MET y analizar el posible rol neuroprotector de MOD frente al daño dopaminérgico inducido por MET nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

### I. Estudiar el efecto estimulante de una única inyección de MOD y de MET a distintas dosis.

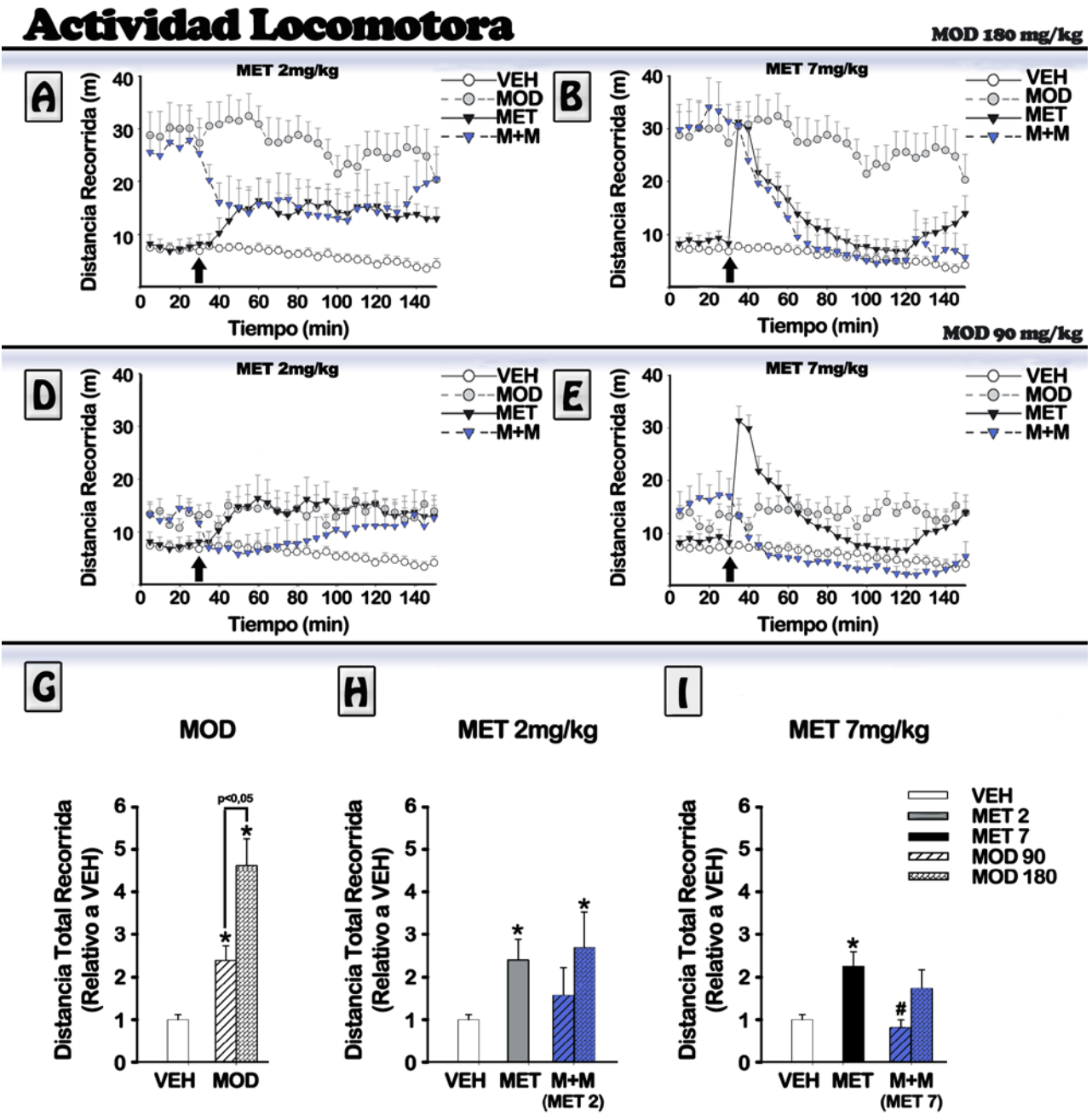
#### a. Respuesta locomotora en campo abierto

Al ser MOD y MET compuestos con propiedades estimulantes nos planteamos evaluar la interacción de ambas drogas mediante el registro de la respuesta locomotora inducida por ambas. Ya que la exposición simultánea a dos o más sustancias puede resultar en una adición, sinergia o antagonismo de los efectos particulares de cada una se probaron distintas dosis de MET y de MOD. MET fue administrada a una dosis baja (2 mg/kg) con el propósito de no alcanzar un nivel máximo de respuesta (efecto techo) en caso de que la administración de MOD resultase aditiva o sinérgica. Así mismo, se utilizó una dosis alta de MET (7 mg/kg) con el objeto de poder evaluar un posible efecto antagónico entre ambos estimulantes ya que partiríamos desde valores altos de locomoción. A su vez, los animales fueron tratados con una dosis media (90 mg/kg) y otra alta (180 mg/kg) de MOD con la intención de elegir para el resto de los experimentos de la tesis la dosis que mejor perfil de efectos favorables posea.

En la **Figura I.7** se puede observar que:

- La actividad locomotora inducida por MOD fue significativamente mayor para la dosis de 180 mg/kg respecto de la dosis de 90 mg/kg.
- En el grupo MET, el perfil de hiperlocomoción para la dosis de 2 mg/kg mostró forma de meseta y se mantuvo estable durante las dos horas de registro. La dosis de 7 mg/kg indujo un efecto hiperlocomotor en forma de pico que rápidamente se continuó con una disminución de la locomoción a valores comparables al grupo VEH para luego incrementarse nuevamente hacia el final del registro.
- En los grupos MET + MOD (M+M) se observó una actividad locomotora significativamente menor para la dosis de MET de 7 mg/kg junto con MOD 90 mg/kg. Sin embargo, si se tiene en cuenta el hecho de que los animales que sólo recibieron MOD 180 mg/kg mostraron una

actividad locomotora de más de 4 veces el valor de VEH, el hecho de haber administrado MET disminuyó la locomoción inducida por MOD ( $p < 0,05$ ).



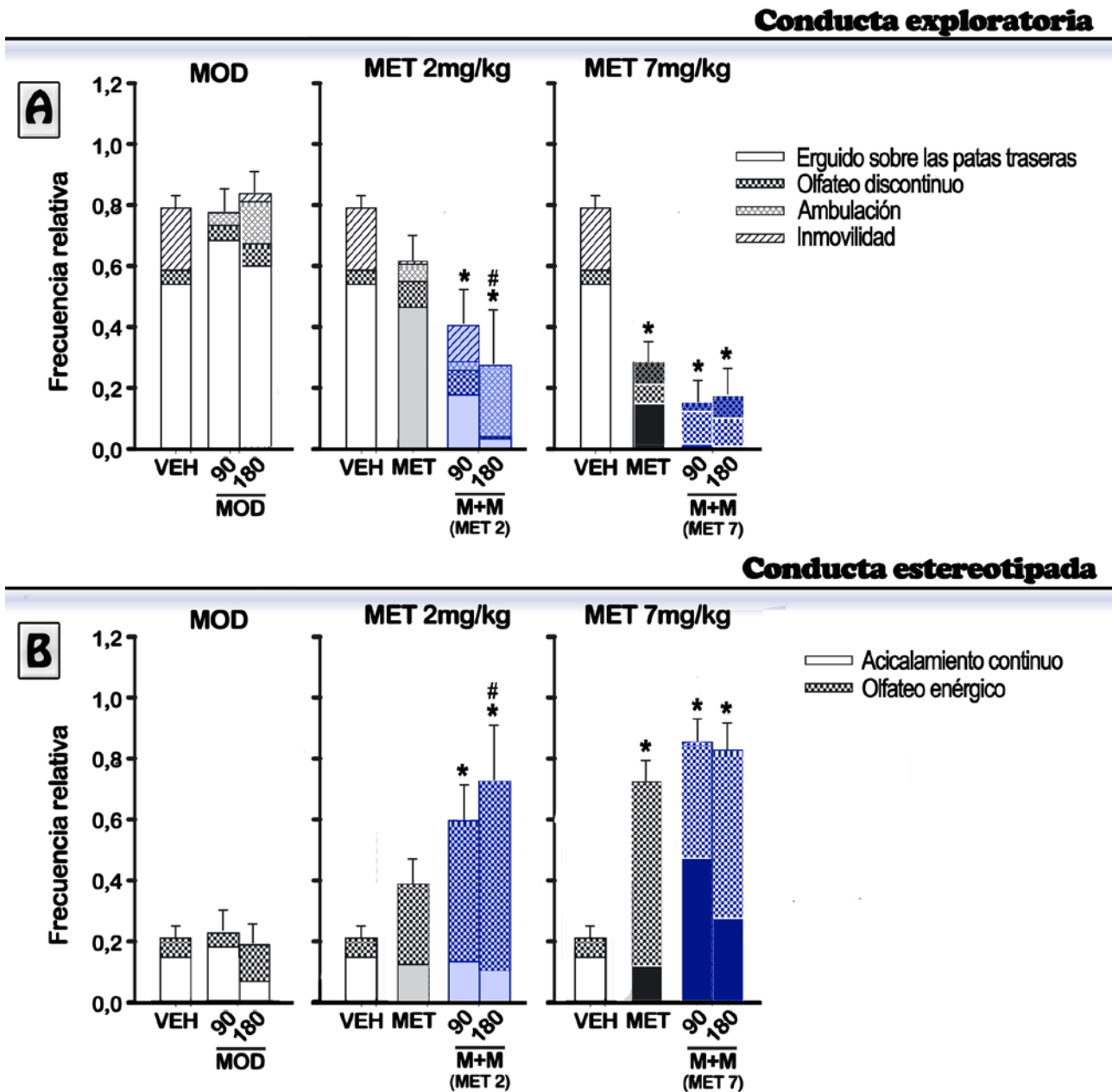
**Figura I.7. Efecto agudo de la coadministración de MOD con MET sobre la locomoción.** Se registro la conducta locomotora durante 150 min con el software Ethovision (Noldus). Los datos se muestran como el promedio de la distancia recorrida (en intervalos de 5 min)  $\pm$  SEM ( $n = 5-22$ ) (A-E). Las flechas negras representan el momento de la inyección de MET/Solución salina. MOD fue administrado a una dosis de 180 mg/kg (panel superior) o 90 mg/kg (panel del medio) 1 hora previa a la administración de MET 2 mg/kg (A y D) o 7 mg/kg (B y E). Los grupos VEH y MET se muestran repetidos para cada dosis de MOD con el objeto de facilitar la comprensión de la Figura. En el panel inferior se muestra el promedio de la distancia total recorrida en las 2 horas posteriores a la inyección de MET para los grupos que recibieron MOD (G), para los grupos tratados con MET 2 mg/kg (H) y para los grupos tratados con MET 7 mg/kg (I). ANOVA de una vía seguido de la prueba Tukey-Cramer: \*,  $p < 0,05$  vs. VEH, #,  $p < 0,05$  vs. MET.

## b. Conductas estereotipadas

La administración sistémica de anfetaminas en roedores induce un incremento en la actividad motora que, a dosis mayores, es reemplazado por conductas repetitivas y compulsivas denominadas estereotipias (Kuczenski y Segal, 1999). Las estereotipias inducidas por MET persisten por varias horas y pueden ser atenuadas si se administra un antagonista dopaminérgico (Hamamura y cols., 1991) adjudicándole una participación en su expresión de esta conducta al sistema dopaminérgico.

Basándonos en lo anteriormente mencionado, nos propusimos determinar si la disminución de la actividad locomotora observada en el grupo M+M era debida a que los animales pasaban más tiempo realizando conductas estereotipadas (escala modificada de Creese y Iversen, 1974). La **Figura I.8** muestra la frecuencia relativa promedio de expresión de conductas locomotoras y estereotipadas para las distintas combinaciones de dosis de MOD y MET y se puede observar que:

- Los animales tratados con la dosis de 7 mg/kg de realizaron con más frecuencia conductas estereotipadas y con menos frecuencia conductas exploratorias.
- MOD no indujo cambios en el patrón de conducta exploratoria a ninguna de las dosis estudiadas.
- La administración de MOD 1 hora antes de la inyección de MET no fue capaz de prevenir el aumento de frecuencia de expresión de estereotipias inducido por MET 7 mg/kg.
- Para la dosis de 2 mg/kg de MET, cuyo patrón de expresión de conductas exploratorias y estereotipadas no fue diferente a la del grupo VEH, la coadministración de MOD indujo la expresión de estereotipias. Más aún, la dosis de MOD de 180 mg/kg aumentó la frecuencia de expresión de estereotipias a valores significativamente mayores que los inducidos por MET.



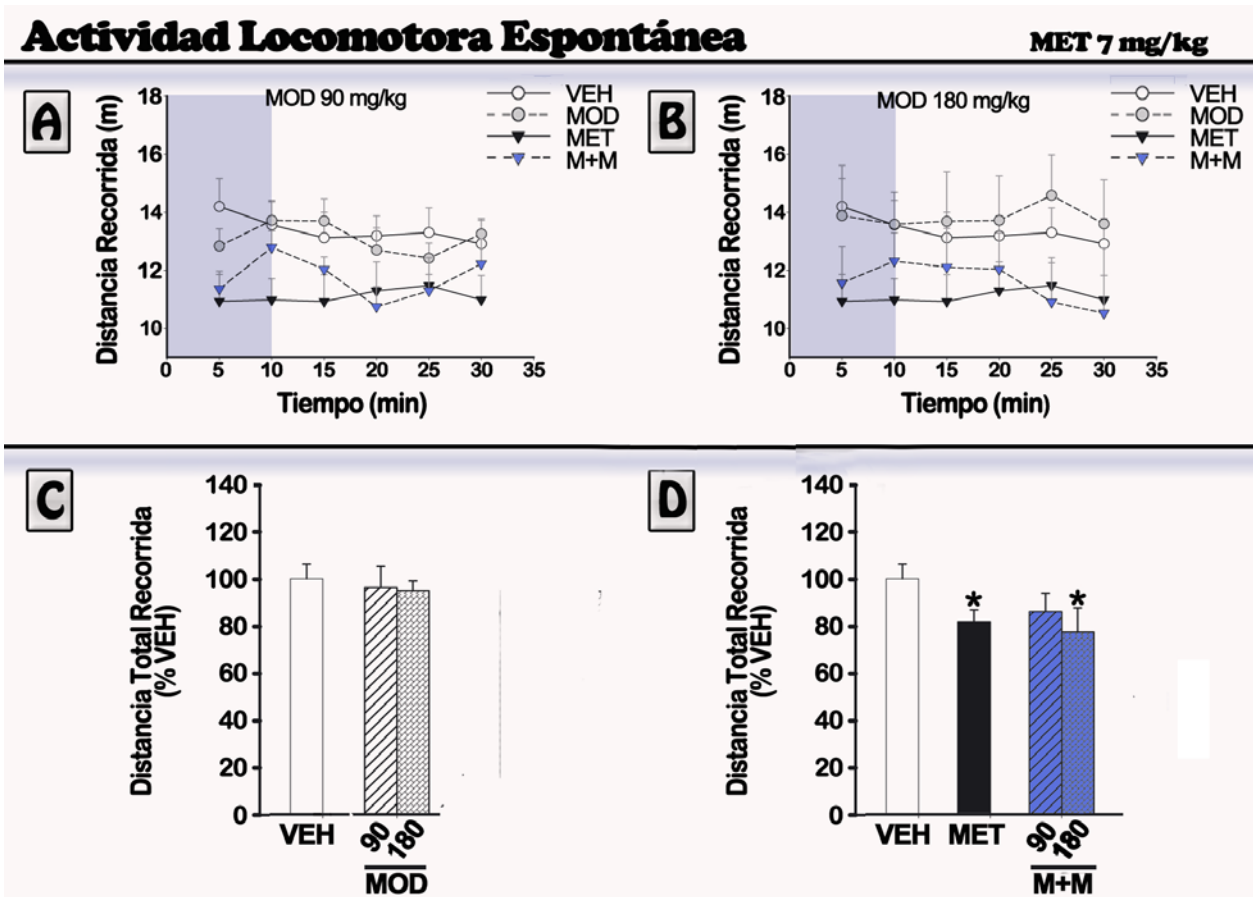
**Figura 1.8. Efecto agudo de la administración conjunta de MOD y MET sobre la expresión de conductas estereotipadas.** A partir de los videos utilizados para analizar la actividad locomotora se determinó el patrón de conducta de cada animal utilizando una versión modificada de la escala de Creese e Iversen de estereotipias. Los resultados se muestran como la frecuencia promedio de ejecución de conductas exploratorias (A, valores de 0 a 3 de la escala) y conductas estereotipadas (B, valores 4 y 5 de la escala). ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey-Cramer: \*,  $p < 0,05$  vs. VEH, #,  $p < 0,05$  vs. MET.

II. Estudiar del efecto neuroprotector de MOD luego de la administración de un protocolo tóxico de MET (*binge*).

a. Locomoción espontánea.

Se procedió a evaluar las consecuencias de los tratamientos sobre la actividad exploratoria espontánea 6 días posteriores al tratamiento de los animales con un *binge* tóxico de MET (3x7 mg/kg i.p., cada 3 horas, **Esquema I.1**) como se muestra en la **Figura I.9** donde se observa que:

- El tratamiento con un *binge* de MET disminuyó la actividad locomotora espontánea.
- La administración de MOD no alteró la actividad locomotora espontánea.
- La coadministración de MOD 90 mg/kg junto con un *binge* de MET previno parcialmente la alteración de esta conducta, mientras que la dosis de 180 mg/kg no logró prevenirla.



**Figura I.9.** Efecto de la coadministración de MOD y MET sobre la locomoción espontánea registrada 6 días después del tratamiento. En el panel superior se muestra la distancia recorrida promedio (en intervalos de 5 min.)  $\pm$  SEM ( $n = 7-14$ ) registrada 6 días después de la administración de MOD 90 mg/kg junto con un *binge* de MET (**A**) o 180 mg/kg (**B**). En el panel inferior se muestra la cuantificación de la distancia total recorrida (en % de VEH)  $\pm$  SEM durante los primeros 10 minutos de registró (conducta exploratoria) para el grupo tratado con MOD (**C**) y para los grupos que recibieron MET (**D**). ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey-Cramer: \*,  $p < 0,05$  vs. VEH, #,  $p < 0,05$  vs. MET.

**b. Cambios neuroquímicos**

Las determinaciones neuroquímicas se realizaron en el estriado debido a que es el área cerebral que posee una robusta inervación dopaminérgica y, por extensión, un área sensible para estimar el grado de alteración dopaminérgica inducida por MET 6 días posteriores al tratamiento.

**Contenido de DA estriatal por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

Con el objetivo de analizar el grado de depleción de dopamina inducido por el tratamiento tóxico con MET se determinó el contenido de dopamina (DA) y sus respectivos metabolitos en el estriado de ratones tratados con el binge de MET (**Tabla I.1**). El metabolito DOPAC es producido por la deaminación intracelular de la DA por la enzima MAO (Kopin, 1985). El HVA, en cambio, es el resultado del metabolismo combinado de la MAO y de la COMT (Kopin, 1985; Kopin, 1994), siendo la relación [DOPAC+HVA]/DA comúnmente utilizada como un indicador del grado de liberación y consecuente metabolización de la DA (turn-over de DA). Así, en la **tabla 1.1** se puede observar:

**Dopamina**

TRATAMIENTO	VEH	MET (3x7mg/kg)	MOD (90mg/kg)	M+M (90mg/kg)	MOD (180mg/kg)	M+M (180mg/kg)
DA	100,0±4,0	37,1±3,2*	103,6±5,8 <sup>#</sup>	108,5±14,8 <sup>#</sup>	93,9±11,9 <sup>#</sup>	96,4±3,3 <sup>#</sup>
DOPAC	100,0±5,8	45,3±4,2*	111,0±8,1 <sup>#</sup>	94,6±15,9 <sup>#</sup>	79,6±12,7	99,8±6,9 <sup>#</sup>
HVA	100,0±3,7	61,5±3,0*	104,2±5,4 <sup>#</sup>	90,6±10,0 <sup>#</sup>	88,9±10,1 <sup>#</sup>	99,2±5,4 <sup>#</sup>
[DOPAC+HVA]/DA	1,00±0,04	1,50±0,13*	1,07±0,12 <sup>#</sup>	0,88±0,11 <sup>#</sup>	0,90±0,13 <sup>#</sup>	1,04±0,13 <sup>#</sup>

**TABLA I.1. Efecto de la co-administración de MOD junto con un binge de MET sobre el contenido endógeno de DA y sus metabolitos.** Se determinó el contenido de DA, sus metabolitos y el recambio de DA 6 días posteriores a la administración de un binge de MET (Resaltado en azul; 3x 7mg/kg i.p., cada 3 horas) por el método de HPLC. Los resultados se expresan como % del grupo VEH ± SEM (n= 6-13). ANOVA de una vía. Prueba de Tukey-Cramer para muestras desbalanceadas: \*, p<0,05 vs. VEH; <sup>#</sup>. p<0.05 vs. MET.

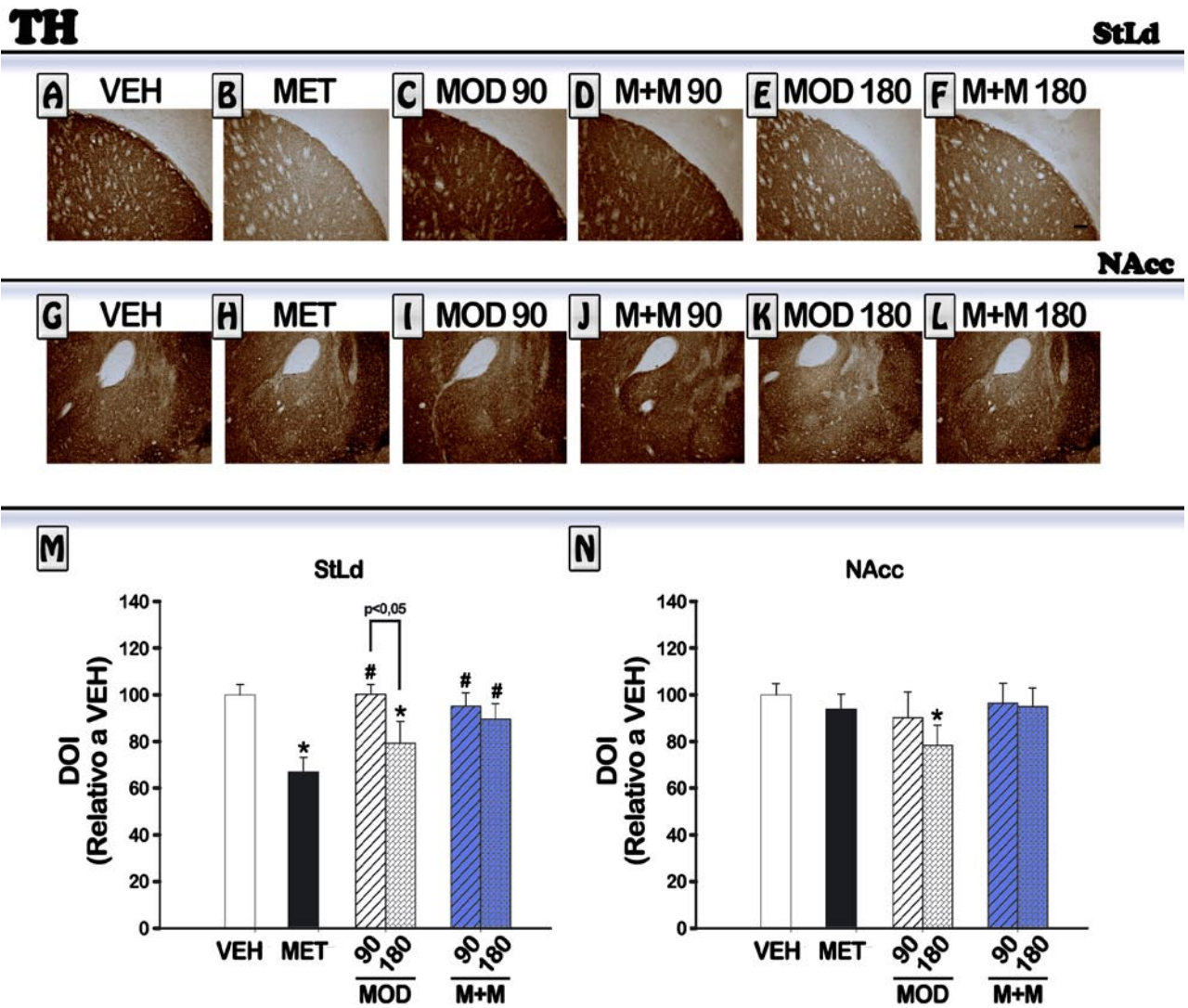
- Una disminución del contenido de DA estriatal y de sus metabolitos DOPAC y HVA en los ratones del grupo tratado con MET respecto del grupo VEH.
- La administración de MOD revirtió la disminución del contenido de DA y sus metabolitos en el estriado observada luego del tratamiento con MET.
- La relación [DOPAC+HVA]/DA en el grupo MET se encontró aumentada, lo que podría significar que más DA está siendo metabolizada.

### Análisis histológico de marcadores de los terminales dopaminérgicos en el Estriado

Dado que TH es la enzima limitante en el proceso de síntesis de DA, su detección por inmunohistoquímica es comúnmente utilizada para evaluar daño a las terminales dopaminérgicas. Como se muestra en la **Figura I.10** observamos:

- Una disminución de los niveles de TH en el StLd pero no en el NAcc en aquellos ratones que recibieron MET.
- La administración de MOD 90 mg/kg por si solo no alteró los niveles de TH y, al ser administrado junto con un *binge* de MET, previno la disminución de TH inducida por MET.
- La coadministración de MOD 180 mg/kg mostró ser protectora frente a la disminución de los niveles de TH inducidos por MET pero disminuyó en los niveles de TH tanto en el StLd como en el NAcc.





**Figura I.10.** Determinación del efecto de MOD sobre la disminución de la inmunorreactividad para TH 6 días luego del tratamiento con MET. Imágenes representativas del efecto del tratamiento sobre la inmunomarcación para TH en el estriado dorsal-lateral (StLd, **A-F**) y el NAcc core (NAcc, **G-L**) y sus respectivas cuantificaciones (**M-N**). Los resultados se expresan como densidad óptica integrada (DOI) en porcentaje del grupo VEH ± SEM (n= 5-8). ANOVA de una vía seguido de la prueba LSD de Fisher. \*, p<0,05 vs. VEH, #, p<0,05 vs. Igual dosis de MET, &, p<0,05 vs. Igual dosis de MOD.

## D. DISCUSIÓN

Se cree que la hiperlocomoción observada luego de la administración de estimulantes anfetamínicos estaría mediada por el estriado ventral, mientras que la expresión de estereotipias estaría relacionada con la función del estriado dorsal (Kelly y Iversen, 1976), siendo la estimulación dopaminérgica del estriado particularmente responsable de la expresión de estereotipias motoras (Arnt y cols., 1985; Creese e Iversen, 1972). Dado que dosis más altas de estimulantes inducen estereotipias, las respuestas estereotipadas resultan útiles para predecir el grado de sensibilización a una droga (Battisti y cols., 1999), la que comprende cambios a nivel neural (Robinson y Berridge, 2008). Estos cambios incluyen el aumento de liberación de DA en el estriado (Creese y Iversen, 1974; Ridley, 1994; Seiden y cols., 1993b), la sensibilización de los receptores dopaminérgicos (Kuczenski y Segal, 1999) y el aumento de la liberación de glutamato en la corteza prefrontal o en el NAcc (Stephans y Yamamoto, 1994; Tzschentke y Schmidt, 2003).

En nuestros experimentos conductuales nosotros observamos que la administración de MET indujo un aumento de la distancia recorrida a cualquiera de las dosis estudiadas (2 mg/kg y 7 mg/kg). A su vez, la administración de 7 mg/kg de MET no parecería inducir una mayor locomoción respecto de la observada luego de la administración de 2 mg/kg de MET a pesar de estar administrando más del doble de la dosis. Este hecho podría estar relacionado con el aumento de la frecuencia de expresión de estereotipias observada luego de la administración de 7 mg/kg de MET ya que la expresión de estereotipias es necesariamente a costa de una disminución de la locomoción (Seiden y cols., 1993b). Así mismo, el desplazamiento de tipo dosis-dependiente de la conducta locomotora hacia la expresión de conductas estereotipadas luego de la administración repetida de estimulantes anfetamínicos también ha sido descrito por otros autores (Kuczenski y Segal, 1999; Fowler y cols., 2003). Por otro lado, la administración de MOD a ratones, al igual que como fuera reportado por como fue observado por Simon y cols., (1995), indujo un aumento de la locomoción sin cambiar el patrón de conducta hacia la expresión de estereotipias, siendo significativamente mayor la distancia recorrida por los animales para la dosis de MOD 180 mg/kg respecto de la observada luego de administrar 90 mg/kg.

Por último, en lo que respecta a actividad motora, la locomoción observada en el grupo M+M parecería ser menor si se la compara con la locomoción del grupo que recibió una única

inyección de MOD. Esto podría deberse a que los animales que recibieron la combinación de ambos estimulantes pasan más tiempo realizando estereotipias. Este aumento de estereotipias observado cuando ambos estimulantes son administrados conjuntamente podría ser indicativo de un efecto aditivo o sinérgico de ambos sobre la liberación de DA. No obstante, también podría estar siendo exacerbado como consecuencia del estrés generado al administrar ambas drogas juntas ya que estímulos estresores pueden aumentar la adquisición y/o la expresión de la sensibilización de la conducta (Antelman y cols., 1980, Robinson y Becker 1986).

Luego del tratamiento con MET, y según el protocolo de administración (ej. Dosis repetidas) muchos autores han reportado un menor contenido de dopamina estriatal y cambios indicativos de degeneración dopaminérgica. Entre estos últimos se encuentran la argirofilia, la activación astrogliál y la disminución de la marca de TH (Granado y cols., 2010; O'Callaghan y Miller, 1994). El perfil de toxicidad de MET es dependiente de la especie en estudio ya que en el ratones y primates no humanos el daño es principalmente dopaminérgico (Gluck y cols., 2001, Mozley y cols., 2001, O'Callaghan y Miller, 1994), mientras que en ratas la toxicidad dopaminérgica se acompaña también de un daño al sistema serotoninérgico (Hotchkiss y Gibbs 1980).

Cuando nos propusimos evaluar el posible efecto protector de MOD frente a la neurotoxicidad inducida por MET, elegimos estudiar dos variables bioquímicas: los niveles estriatales de dopamina y la disminución de la marca inmunorreactiva para TH. Asimismo, estudiamos la actividad locomotora espontánea 6 días después del tratamiento, la cual también se encuentra alterada luego de un tratamiento tóxico con MET (Bisagno y cols., 2002, Friedman y cols., 1998).

Basándonos en nuestros resultados pudimos observar que el pretratamiento con MOD (a cualquiera de las dosis estudiadas) logró prevenir la disminución del contenido total de DA estriatal inducido por MET. Más aún, pudimos observar un aumento en el índice de recambio de DA en el grupo MET, lo que podría significar que más DA está siendo metabolizada. Una posible explicación sería que las neuronas dopaminérgicas remanentes estarían liberando más DA en un intento de compensar la posible pérdida de terminales con el fin de mantener el tono dopaminérgico.

En relación a los estudios de los cambios en los niveles de TH tuvimos en cuenta el patrón de daño inducido por MET reportado por otros autores (Khun y cols., 2011). En este sentido elegimos estudiar el StLd debido a que esta región forma parte de la vía dopaminérgica nigroestriatal y es particularmente vulnerable a los efectos deletéreos de MET (Kuhn y cols., 2011). Del mismo modo, el estudio de los cambios en los niveles de TH también fue realizado en el NAcc, área que pertenece a la vía dopaminérgica mesolímbica, debido a que esta región es particularmente resistente a los efectos tóxicos de MET (Granado y cols., 2010). Lo que pudimos observar fue que MET indujo una disminución de la marca inmunorreactiva para TH en el StLD y que, tal como fuera reportado por Granado y cols., (2010), la marcación para TH en el NAcc no mostró cambios luego del tratamiento tóxico con MET. En este sentido la coadministración de MOD (90 y 180 mg/kg) previno la alteración en la marcación para TH inducida por MET en el StLd. Por otro lado, la actividad exploratoria/locomotora espontánea evaluada 6 días después del tratamiento disminuyó luego de la administración de MET y, en este caso, la administración de MOD solo pudo prevenir de forma parcial esta alteración.

En lo que respecta a la administración de MOD cabe destacar que el mismo no una disminución en la actividad locomotora espontánea ni altera el contenido estriatal de DA a ninguna de las dosis estudiadas. No obstante, en relación a TH, la dosis más alta de MOD (180 mg/kg) provocó la disminución de la marca inmunorreactiva tanto en el StLd como en el NAcc. Finalmente, debido a que la dosis de MOD de 90 mg/kg mostró resultados favorables sin evidenciar efectos negativos sobre ningún parámetro estudiado, es que elegimos esta dosis para llevar a cabo el resto de los experimentos de la tesis.

Nuestros resultados sugieren un efecto protector de MOD frente a los efectos neurotóxicos de MET sobre los terminales dopaminérgicos que inervan el estriado, probablemente interfiriendo en su mecanismo de acción. Dado que ambos estimulantes actúan sobre el DAT, podría pensarse que MOD al ser un bloqueante del DAT esta interfiriendo con la entrada de MET a la célula, la reversión del transportador inducida y la consecuente liberación de DA y el desarrollo de la toxicidad.

---

# CAPÍTULO II

---

## A. INTRODUCCIÓN

### **Objetivo específico II: Corroborar que la capacidad neuroprotectora de modafinilo frente a la neurotoxicidad inducida por metanfetamina se mantenga en ratones hembra.**

Han sido descritas diferencias de susceptibilidad a los efectos de MET dependientes del sexo tanto animales como en seres humanos (Dluzen y Liu, 2008). El alcance del daño inducido por MET sobre la vía nigroestriatal resulta mayor en machos que en hembras (Dluzen y Liu, 2008; Dulzen y cols., 2010; Heller y cols., 2001), al igual que la cantidad de DA estriatal liberada (Dluzen y Salvaterra, 2005). En contraposición, las hembras son más sensibles a los efectos psicomotores de MET (Dulzen y cols., 2008a; Schindler y cols., 2002). Sin embargo, la diferencia de susceptibilidad a los efectos tóxicos de las sustancias varía con la sustancia en cuestión. En este sentido, las hembras pueden ser más susceptibles que los machos frente a los efectos tóxicos de otros compuestos que afectan el funcionamiento del sistema nervioso central, como lo son: el etanol (Alfonso-Loeches y cols., 2013), el PCP (Olney y cols., 1991) y el MK-801 (D'Souza y cols., 2002), ambos antagonistas del receptor NMDA.

Se sabe que las hembras poseen más copias de DAT que los machos y una mayor recaptación vesicular de DA por parte del VMAT-2 (Bhatt y Dluzen, 2005, Poth y cols., 2012). Este hecho podría estar vinculado con la menor sensibilidad en hembras a la toxicidad inducida por MET. En este sentido, si la neuroprotección frente a los efectos tóxicos de MET por parte de MOD estuviera relacionada con el bloqueo del DAT, entonces las hembras podrían ser menos susceptibles a los efectos neuroprotectores de MOD.

De forma análoga, si la susceptibilidad a los efectos neurotóxicos de los compuestos varía con el sexo de los animales, entonces no podemos asegurar que la administración de MOD a hembras no induce daño a las terminales dopaminérgicas.

Por todo esto, en este capítulo nuestro objetivo fue corroborar que MOD a la dosis estudiada no fuera tóxico para los terminales dopaminérgicos que inervan el estriado de ratones hembra tratados con un protocolo tóxico de MET. Así, una vez descartada la posibilidad de daño inducida por MOD, podremos confirmar si el efecto protector de MOD, previamente descrito en ratones macho, es reproducible en ratones hembra.

## B. METODOLOGÍA

### I. Animales

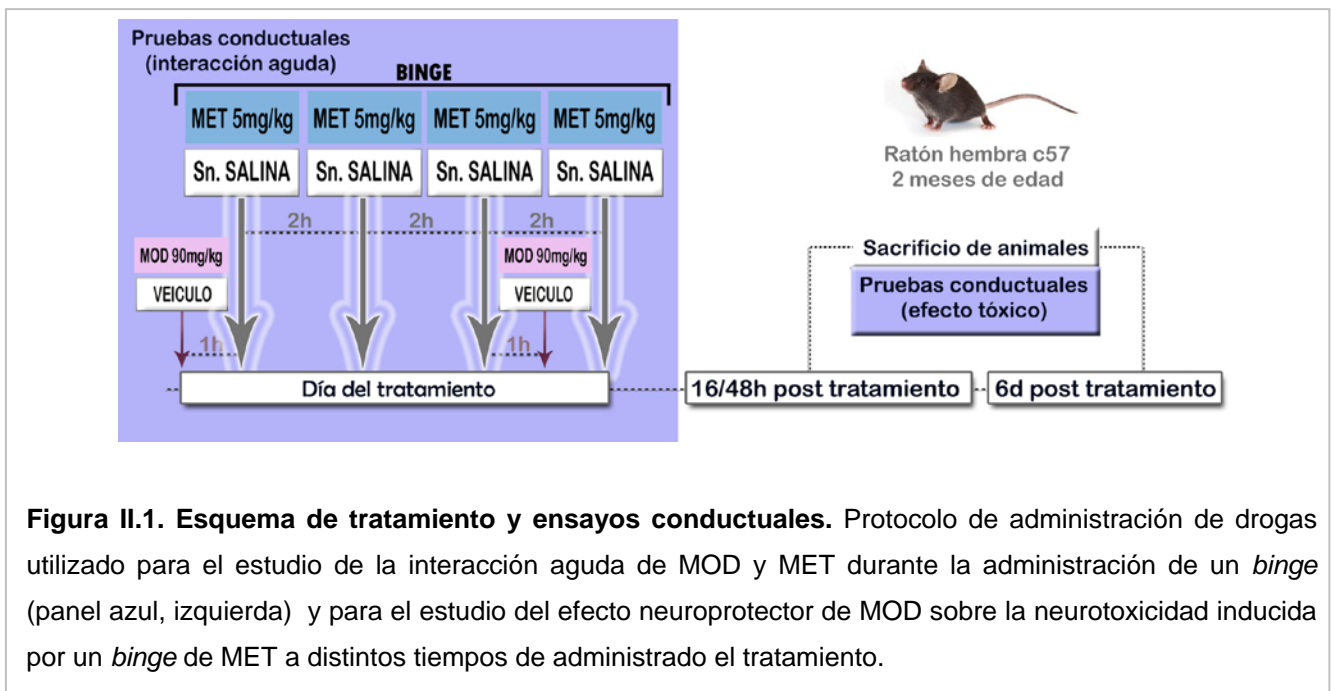
Se utilizaron ratones hembras de 8 semanas de edad (18-23 g) de la cepa C57/BL6 provistas por el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron agrupados de a 3-5 animales por jaula con libre acceso al agua y la comida, en una sala con temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), humedad relativa ( $55 \pm 15\%$ ) y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas de acuerdo con las regulaciones locales (SENASA, Argentina) en el bioterio del Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio del National Research Council (EE.UU., 2010).

### II. Protocolo de administración de drogas.

Para inducir la toxicidad dopaminérgica en hembras se administró un *binge* tóxico de MET (4 inyecciones i.p. de 5 mg/kg, cada 2 horas) como fue descrito por Thomas y cols., (2004). A su vez, cuando fue requerido, se administraron dosis de 90 mg/kg de MOD una hora antes de la primera y de la última inyección de MET como se muestra en el **Figura II.1**. La preparación de las drogas fue realizada de la misma forma descrita en el capítulo I.

### III. Respuesta locomotora en campo abierto

Se determinó la distancia total recorrida (en intervalos de 5 minutos) a partir de los 30 minutos previos a la administración de MOD y durante las 8 horas subsiguientes a la misma (**Figura II.1**). La actividad locomotora espontánea se analizó mediante el registro de la distancia recorrida por los animales por un periodo de 30 minutos 6 días después del tratamiento. Para este fin se utilizaron cajas plásticas de 19 x 40 x 40 (en cm) y el software Ethovision XT 5.1 (Noldus) para el análisis y la adquisición de los videos del mismo modo en que fue descrito en el capítulo I.



#### IV. Cuantificación de catecolaminas por HPLC

Según lo detallado en el **capítulo I**.

#### V. Análisis de la coordinación motora

Se utilizó el ensayo de rotarod que permite estudiar coordinación motora y balance de los animales. El dispositivo consiste en una barra giratoria de 3 cm de diámetro, colocada a una altura de 17 cm, que gira a una velocidad de 16 rpm. El ensayo fue llevado a cabo una hora después de haber registrado la actividad locomotora espontánea. Los animales recibieron un entrenamiento de 10 minutos durante los cuales fueron colocados nuevamente sobre la barra ante cada caída. Dos horas después del entrenamiento, se registró el número total de caídas de cada animal durante un periodo de 5 minutos.

#### VI. Técnicas histoquímicas

##### e. Obtención del material histológico

Los animales fueron anestesiados con ketamina (0,5ml/kg i.p., Holliday-Scott) y xilazina (1,4ml/kg i.p., Kensol-König) y perfundidos transcárdiacamente con 20ml de PBS 10mM heparinizado (pH 7,4, Heparina sódica 1000UI/L) seguido de 80ml de PFA 4% a PB 0,1M (pH 7.4). Luego de extraídos, los cerebros fueron fijados en PFA 4°C por 16 horas y posteriormente fueron separados los hemisferios cerebrales. Uno de los hemisferios fue



crioprotegido en sacarosa 30% PB 0,1M durante 48 horas y cortado con un micrótopo de congelación en secciones coronales de 25  $\mu\text{m}$  de espesor. El otro hemisferio permaneció en una solución de PBS 0,1M hasta el momento de ser seccionado en rodajas coronales de 50  $\mu\text{m}$  coronales con vibrátomo.

**f. Inmunohistoquímica colorimétrica para TH**

Mismo procedimiento detallado para TH en el capítulo I.

**g. Inmunohistoquímica colorimétrica para DAT**

Se realizó el mismo procedimiento utilizado para la detección de TH con modificaciones. Para la determinación de los niveles de expresión de DAT no se amplificó la reacción con el complejo ABC y luego de la incubación con el anticuerpo primario monoclonal anti-DAT producido en rata (1:500, Millipore, USA) los cortes fueron enfrentados a una solución de anticuerpo secundario anti-rata directamente acoplado a la enzima peroxidasa (1:1000, Sigma Aldrich, USA).

**h. Cuantificación de la densidad óptica integrada para DAT**

Mismo procedimiento detallado para TH en el capítulo I.

**VII. Análisis estadístico**

Se utilizó el paquete estadístico InfoStat versión 2013 y en todos los casos se consideraron significativas las diferencias con un valor de  $p < 0,05$ . El análisis de datos correspondientes a cambios de actividad locomotora en el tiempo se realizó mediante el ANOVA de medidas repetidas. Para el estudio de cambios histoquímicos entre los tiempos 16 horas, 48 horas y 6 días se realizó el ANOVA de dos factores (tiempo y tratamiento) seguido de la prueba de la mínima diferencia significativa de Fischer (LSD) siempre que la variable siguiera una distribución normal y cumpliera con el supuesto de homocedasticidad. En caso de no cumplirse los supuestos, se procedió a la transformación de los datos. En caso de haber interacción entre los factores se procedió al análisis de factores simples para hallar las diferencias entre los grupos. Para el análisis de los resultados del ensayo de Rotarod se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Dunn.

## C. RESULTADOS

Para poder corroborar que la capacidad neuroprotectora de MOD frente a la neurotoxicidad inducida por MET se mantiene en ratones hembra nos planteamos evaluar lo siguiente:

### I. Interacción de MOD y MET durante un protocolo de *binge*:

#### a. *Respuesta locomotora en campo abierto*

Registramos la actividad locomotora de hembras tratadas con un protocolo de *binge* de MET coadministrado con MOD 90 mg/kg. Con el objeto de garantizar la neurotoxicidad inducida por MET en hembras, debido a la diferente susceptibilidad de género a los efectos tóxicos de la droga, se utilizó un protocolo de tratamiento distinto del utilizado en el capítulo I. Dado que la neurotoxicidad de MET en ratones hembra fue evidenciada previamente por Thomas y cols (2004), decidimos seguir con este protocolo de tratamiento como modelo en el que MET fue administrada i.p. (4 x 5 mg/kg, cada 2 horas). Como se puede observar en la **Figura II.2**:

- Luego de ambas inyecciones de MOD se observó un aumento gradual de la locomoción que luego disminuye en forma gradual probablemente debido a que la droga comienza a ser metabolizada (La vida media de MOD en roedores es de 1h; Dawson y cols., 2012).
- En el caso de MET, el aumento de la respuesta motora se dio en forma de pico luego de la primera inyección de MET. Luego de la segunda, tercera y cuarta inyección de MET se observó una disminución abrupta de la actividad locomotora como consecuencia de la disminución de la distancia recorrida por los animales.
- Administrar MOD junto con un *binge* de MET resultó en una menor locomoción acumulada respecto de lo observado para cada grupo de tratamiento al ser evaluado por separado.

## Actividad locomotora

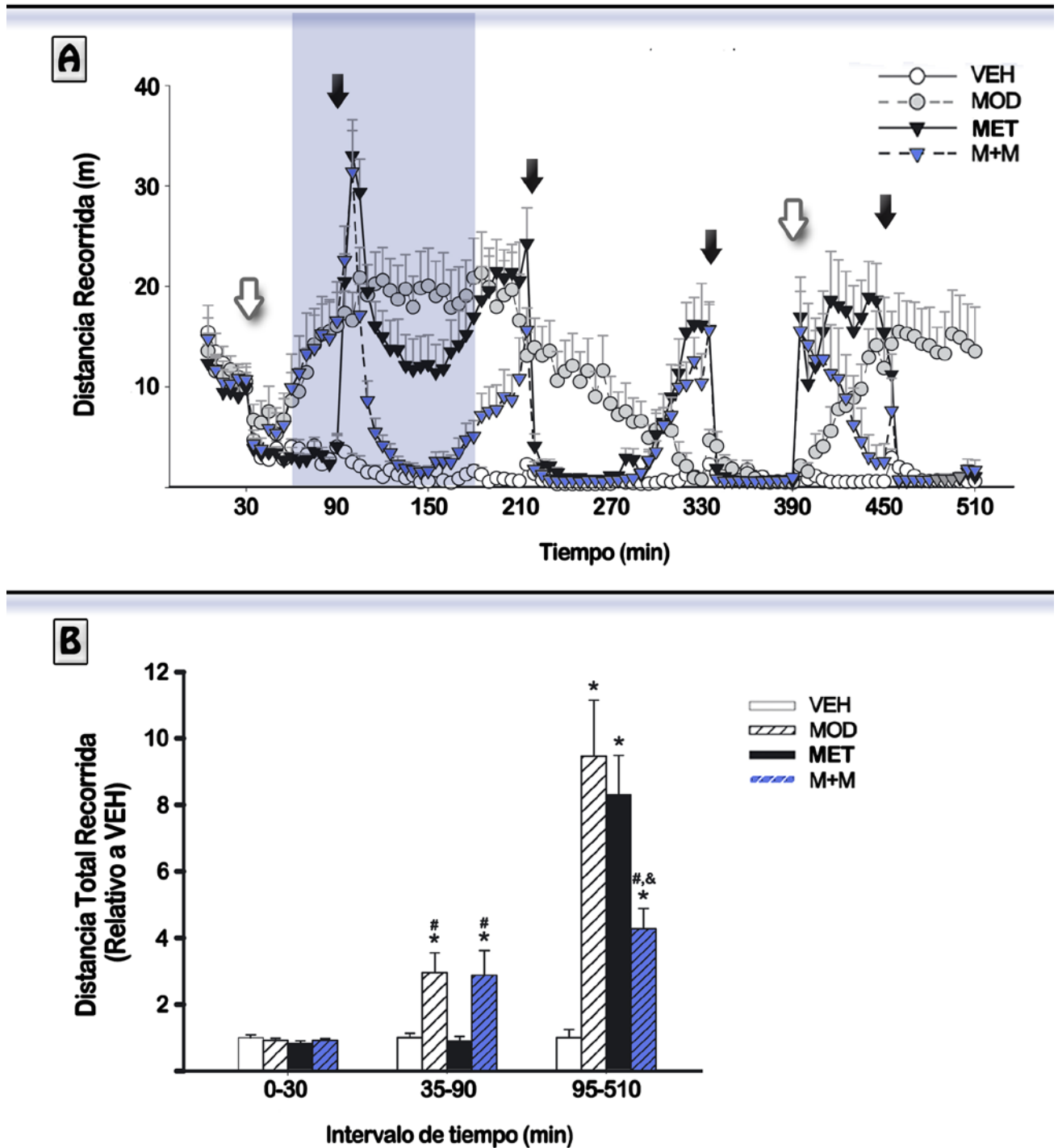


Figura II.2. Efecto agudo de la administración de MOD y MET en la locomoción. **(A)** La distancia promedio recorrida  $\pm$  SEM ( $n = 5-8$ ) fue registrada y analizada durante el tratamiento con el software Ethovision (Noldus) y cada punto del grafico corresponde a la distancia total promedio recorrida en intervalos de 5 min. Las flechas blancas representan el momento en que MOD/VEH fue administrado y las negras representan el momento de administración de MET/Sn. salina. Se resalta en azul el tiempo de registro abarcado en el experimento del capítulo anterior. **(B)** En el panel inferior se muestra la distancia total recorrida previo a la administración de MOD (0-30 min), luego de administrar MOD (35-90 min) y una vez iniciado el *binge* de MET (95-510 min). Two-Way ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba LSD de Fisher. \* $p < 0.05$  vs. VEH, #  $p < 0.05$  vs. MET, &  $p < 0.05$  vs. MOD.

## II. Estudiar el efecto neuroprotector de MOD frente a la depleción dopaminérgica inducida por el tratamiento con MET:

En esta sección evaluamos el daño hacia los terminales dopaminérgicos que inervan el estriado mediante el análisis del contenido endógeno de DA y sus metabolitos y el estudio de la alteración de la locomoción espontánea 6 días luego del tratamiento (Bisagno y cols., 2002, Wallace y cols., 1999).

### a. Depleción de dopamina en el estriado.

Se procedió a la cuantificación de Da y sus metabolitos 6 días después de la administración de un protocolo de binge (4x 5mg/kg, cada 2 horas) como se muestra en la **Tabla II.1**.

### Dopamina

TRATAMIENTO	VEH	MOD	MET	M+M
DA	100,0±11,2	76,0±6,7	<b>60,2±7,8*</b>	80,9±9,1
DOPAC	100,0±11,4	79,3±8,3	71,7,2±8,9	90,2±16,0
HVA	100,0±32,5	77,7±16,5	103,6±29,6	115,3±25,4
[DOPAC+HVA]/DA	1,00±0,04	1,16±0,26	1,28±0,17	1,19±0,16

**TABLA II.1. Efecto de la administración conjunta de MOD con un binge de MET sobre el contenido estriatal de DA y sus metabolitos.** Seis días posteriores al tratamiento con un binge de MET se determinó el contenido de dopamina estriatal y sus metabolitos por el método de HPLC. Los resultados se expresan como valores relativos al grupo VEH (en porcentaje) ± SEM (n= 5-7). ANOVA de una vía seguido de la prueba de Fisher.\*p<0.05 vs. VEH.

Como se muestra en la tabla **II.1**:

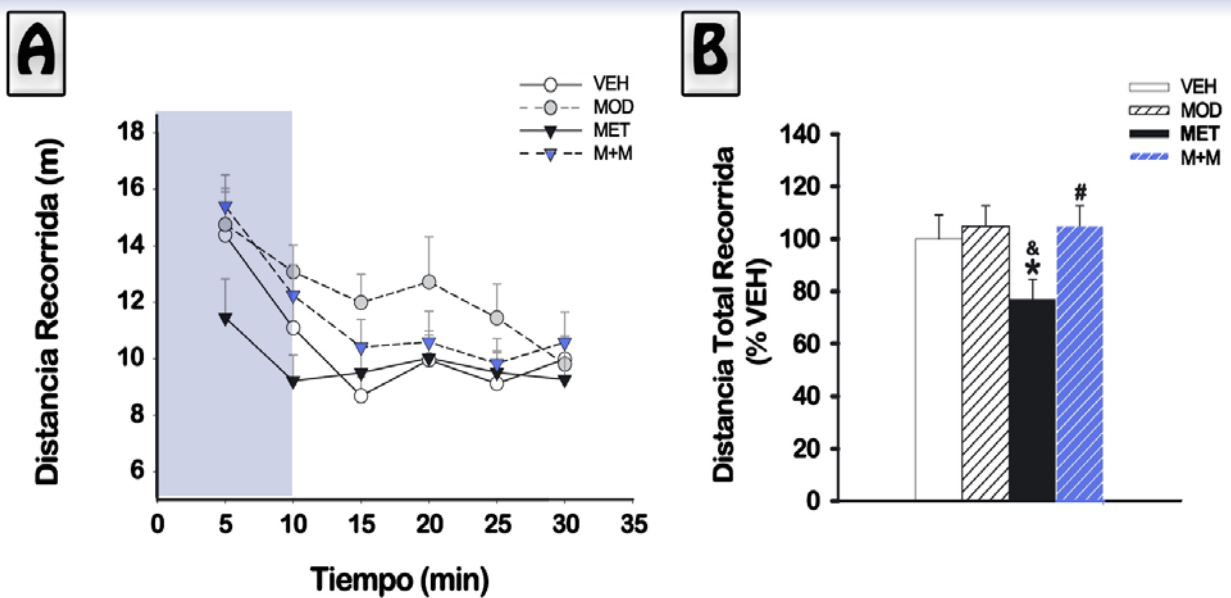
- El tratamiento con MET produjo una disminución significativa del contenido endógeno de DA en el estriado, no así de sus metabolitos que se acompaña de una tendencia al aumento del cociente [(DOPAC+HVA)/DA].
- La administración de MOD no alteró de manera significativa los niveles estriatales de DA y sus metabolitos.
- La administración de MOD previa a MET previno la depleción del contenido de dopamina en el estriado.

**b. Locomoción espontánea.**

Se procedió a evaluar si existía un déficit en la actividad motora relacionado con la depleción dopaminérgica 6 días posteriores a la administración del *binge* tóxico de MET. Cuando se registró la actividad locomotora espontánea en un campo abierto (**Figura II.3**), se observó que:

- La actividad locomotora y/o exploratoria resultó ser significativamente menor en el grupo tratado con MET pero no en el grupo que recibió el tratamiento con MOD.
- La administración de MOD previno esta disminución de la actividad exploratoria inducida por MET.

**Actividad locomotora espontánea**

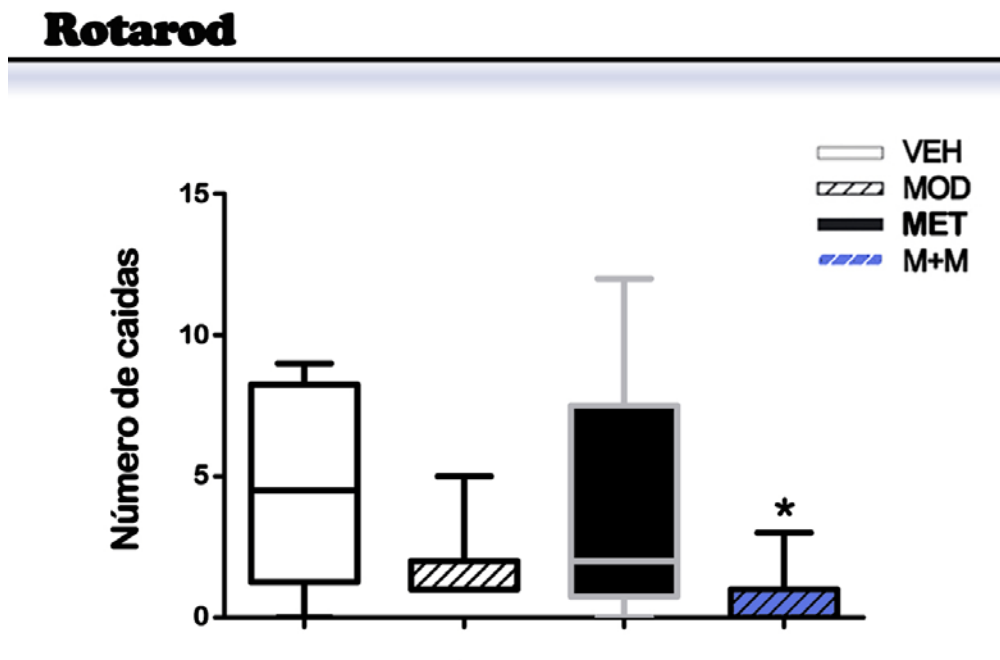


**Figura II.3. Efecto de MOD sobre la actividad locomotora espontánea luego de la administración de un *binge* de MET. (A)** Actividad locomotora espontánea registrada luego de 6 días de la administración de un *binge* de MET con el software Ethovision (Noldus). Cada punto corresponde a la distancia promedio recorrida ± SEM en un intervalo de 5 minutos (n= 5-8). **(B)** Distancia total recorrida ± SEM luego de 30 minutos de registro (expresada en porcentaje del grupo VEH). ANOVA de una vía seguido de la prueba LSD de Fisher \* p<0.05 vs. VEH, # p<0.05 vs. MET.

*c. Coordinación motora (RotaRod)*

Se realizó el estudio de la performance motora mediante el test de rotarod. Este test permite evaluar si los tratamientos originan incoordinación motora al estimar la habilidad del animal de mantenerse sobre el cilindro sin caerse como una medida de balance o coordinación motora. El ensayo fue realizado a los 6 días posteriores al tratamiento tóxico con MET y los resultados se muestran en la **Figura II.4:**

- En el grupo MET no se observan alteraciones de coordinación motora.
- La combinación de ambos estimulantes mejoró la performance en el test de rotarod.



**Figura II.4. Efecto de administrar MOD junto con un binge de MET en la coordinación motora.** Número de caídas ± rango intercuartil registradas en un periodo de 5 minutos (n= 11-14) luego de 6 días de la administración de un *binge* de MET. Kruscal-Wallis seguido de la prueba de Dunn. \*,p<0,05 vs VEH.

**III. Estudiar el efecto neuroprotector de MOD frente a la toxicidad dopaminérgica inducida por MET en el estriado según:**

*a. Alteraciones histológicas dopaminérgicas en el Estriado:*

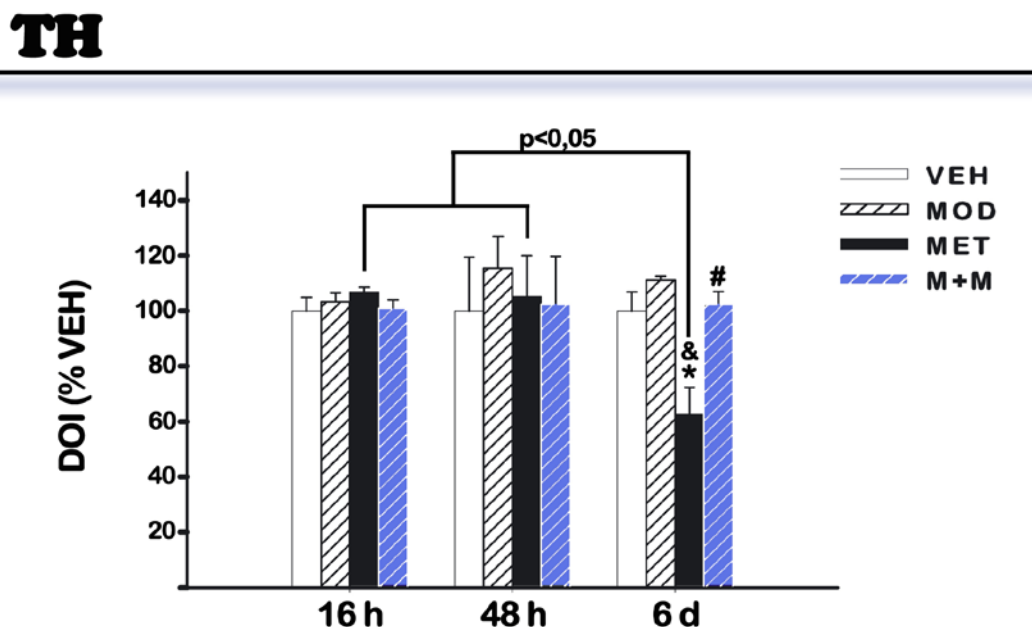
Evaluamos el daño hacia los terminales dopaminérgicos mediante la disminución de los niveles de DAT y de TH en el estriado (Granado y cols., 2010). Para cumplir con este objetivo

los animales fueron sacrificados a tres tiempos diferentes con el propósito de establecer el orden de eventos que derivan en la toxicidad de las terminales dopaminérgicas.

**b. Inmunomarcación para TH en el estriado**

Se evaluó el posible daño a los terminales dopaminérgicos que podría estar acompañando la disminución de DA y la alteración motora observada. Para cumplir con dicho objetivo, los animales fueron sacrificados a tres tiempos diferentes con el propósito de establecer el curso temporal de los eventos que derivan en la toxicidad de los terminales dopaminérgicos. En la **Figura II.5** se muestra la cuantificación final de los niveles de TH y en la **Figura II.6** las fotos representativas de la tinción. En ellas se puede observar:

- La disminución de los niveles de TH en el StLd de ratones hembra tratados con MET. Esta disminución se puede evidenciar recién a los 6 días de administrado el tratamiento.
- MOD previno la disminución de la marcación para TH inducida por MET.
- MOD 90 mg/kg no alteró los niveles de TH en el estriado en ninguno de los tiempos estudiados.
- No se evidenció una disminución significativa de los niveles de TH en el NAcc 6 días posteriores a la administración de ninguno de los tratamientos.



**Figura II.5. Efecto protector de MOD sobre la disminución de la inmunoreactividad para TH a distintos tiempos posteriores al tratamiento con MET.** Los resultados se expresan como densidad óptica integrada (DOI) en porcentaje del grupo VEH ± SEM (n= 5-8). ANOVA de una vía seguido de la prueba LSD de Fisher \* p<0.05 vs. VEH, # p<0.05 vs. MET, & p<0,05 vs MOD.

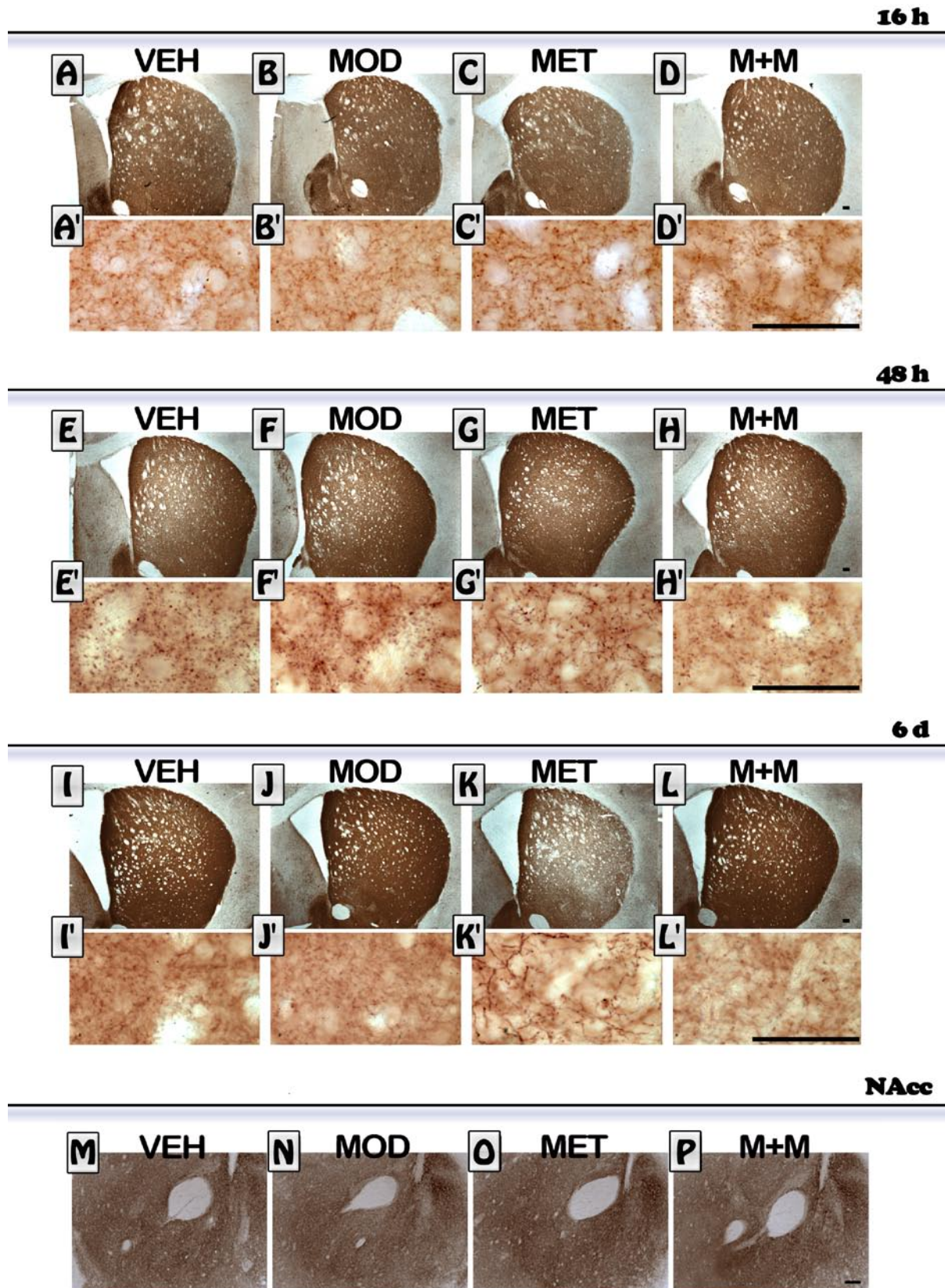


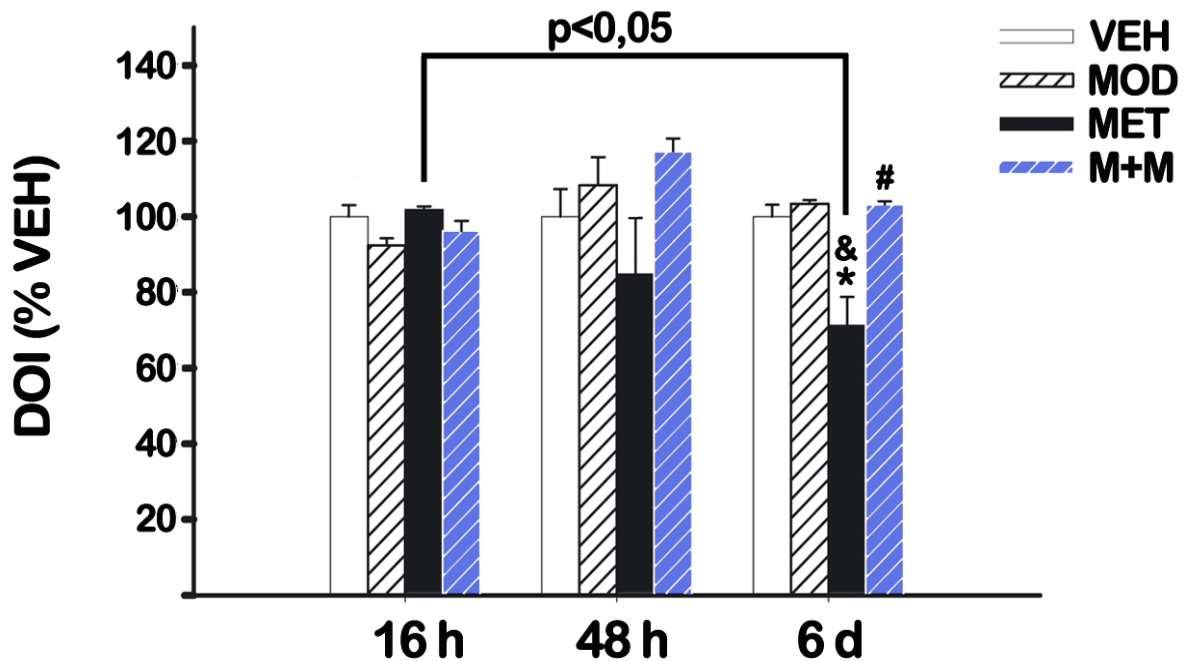
Figura II.6. Efecto protector de MOD sobre la disminución de la inmunorreactividad para TH a distintos tiempos posteriores al tratamiento con MET. Imágenes representativas del efecto del tratamiento sobre la inmunomarcación para TH en el estriado dorsal-lateral (StLd A-L) a las 16 horas (A-D), 48 horas (E-H) y 6 días (I-L) posteriores a MET. En el panel inferior se muestran las imágenes del Nucleo Accumbens core (NAcc, M-P). Escala (A-P): 100µm. Escala (A'-L'): 50µm.



### c. Inmunomarcación para el DAT

Debido a que el DAT está involucrado en el mecanismo de acción tanto de MOD como de MET nos propusimos estudiar los niveles del transportador luego de la administración de ambos estimulantes (Figura II.7 y II.8).

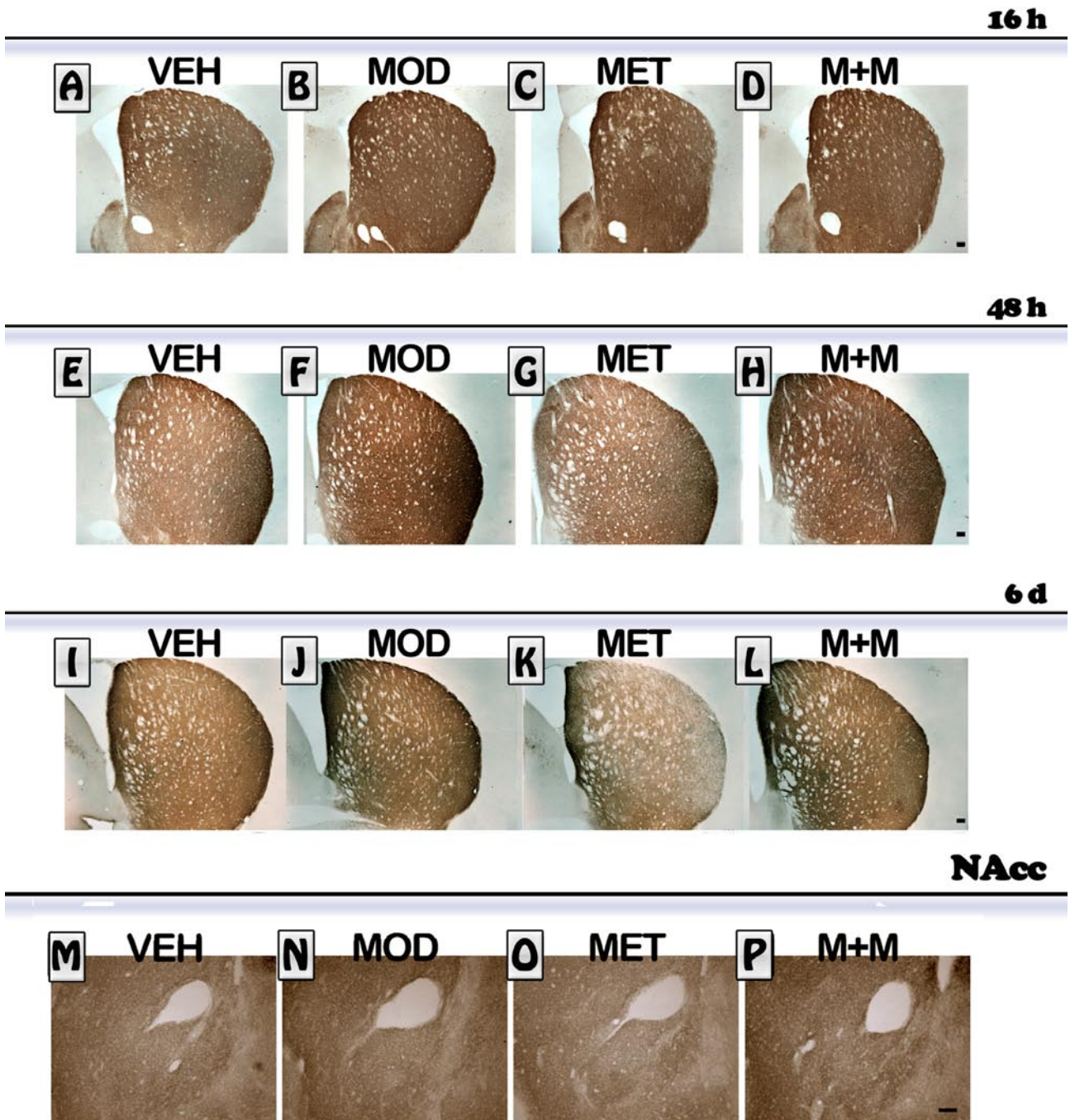
## DAT



**Figura II.7.** Efecto de MOD sobre la disminución de la inmunorreactividad para DAT en el estriado a distintos tiempos posteriores al tratamiento con MET. Los resultados se expresan como densidad óptica integrada (DOI) en porcentaje del grupo VEH  $\pm$  SEM (n= 5-8). ANOVA de una vía seguido de la prueba LSD de Fisher \*  $p < 0.05$  vs. VEH, #  $p < 0.05$  vs. MET, &  $p < 0,05$  vs MOD.

Como se observa en las figuras II.7 y II.8:

- MOD 90 mg/kg no alteró los niveles de DAT en el estriado en ninguno de los tiempos estudiados.
- La inmunomarcación para DAT en el StLd se encontró disminuida en el grupo MET a los 6 días posteriores a la administración de MET mientras que la administración de MOD fue capaz de prevenir esa alteración.
- No se evidenció una disminución significativa de los niveles de DAT en el NAcc a los 6 días posteriores a la administración de MET.



**Figura II.8. Efecto protector de MOD sobre la disminución de la inmunomarcación para DAT a distintos tiempos posteriores al tratamiento con MET.** Imágenes representativas del efecto del tratamiento sobre la inmunomarcación para DAT en el estriado dorsal-lateral (StLd **A-L**) a las 16hs (**A-D**), 48 hs. (**E-H**) y 6 días (**I-L**) posteriores a MET. En el panel inferior se muestran las imágenes del Núcleo Accumbens core (NAcc, **M-P**). Escala: 100µm.

## D. DISCUSIÓN

Como fue discutido en el capítulo I, la administración conjunta de ambos estimulantes podría resultar en el aumento de expresión de estereotipias y, como consecuencia de esto, en la disminución de la respuesta locomotora. Como puede observarse luego de la primera inyección de MET, la distancia recorrida aumenta de forma aguda y, después de cada inyección subsiguiente, disminuye inmediatamente a niveles comparables con el grupo VEH. Esto podría estar relacionado con el hecho de que las concentraciones plasmáticas de MET van aumentando con cada inyección y la inducción de estereotipias se da en forma dosis-dependiente, si bien nosotros no evaluamos la aparición de estereotipias en los experimentos realizados en hembras. De este modo, la coadministración de ambos estimulantes podría estar causando la disminución de la distancia total recorrida por los animales posiblemente bajando el umbral al cual MET induce estereotipias.

Para alcanzar valores comparables de locomoción, Zolkowska y cols., (2009) observaron en su trabajo que MOD inducía una menor liberación de DA en el NAcc que MET. Esto podría estar indicando que el efecto locomotor inducido por MOD depende de un mecanismo que potencia la acción de la DA sin llegar a alcanzar valores sinápticos altos de DA que desencadenen estereotipias. Estos autores también advirtieron que la preadministración de MOD podría atenuar la liberación de DA inducida por MET, no obstante, la DA liberada cuando se combinan ambos estimulantes es mayor que en el grupo control, no pudiendo MOD prevenir las estereotipias inducidas por MET. Así, el bloqueo del DAT por parte de MOD atenúa la liberación de DA inducida por MET pero no sería suficiente para prevenirla. De modo que, no siendo suficiente el bloqueo del DAT por parte de MOD para explicar el efecto protector de MOD en el grupo M+M, no se puede descartar la posible contribución de la acción de MOD sobre los D2R en este efecto.

Por otro lado, las anfetaminas sustituidas causan depleción a largo plazo de DA, acompañada por otros cambios indicativos de toxicidad de terminales nerviosas como lo son la argrofilia (afinidad por la plata debido a la degeneración), incremento de los niveles de GFAP (marcador de gliosis reactiva) y descenso a largo plazo de proteínas presentes en terminales dopaminérgicas como TH.

El protocolo de administración de MET utilizado en este capítulo indujo una disminución del contenido estriatal de DA y la alteración de la actividad locomotora/exploratoria 6 días posteriores al tratamiento. Como esperábamos, el efecto protector de MOD descrito en el capítulo I en machos fue replicado en hembras. No obstante, a diferencia de lo que pudimos observar en machos, el *turn-over* de DA no se encontró alterado en hembras. Esto podría ser atribuido a las diferencias entre el protocolo de administración de MET utilizado en machos y en hembras. Del mismo modo, la actividad locomotora espontánea inducida por MET en hembras pareciera limitarse a los primeros 10 minutos de registro a diferencia de los machos, donde la alteración pareciera ser más importante, abarcando los 30 minutos de registro (ver capítulo I)

En lo que respecta a la coordinación motora, al igual que lo observado por Jeng y cols., (2006) una semana después de administrar un *binge* de MET no observamos una alteración en esta conducta. Es posible que en este caso la depleción dopaminérgica no sea suficiente para observar la alteración de la coordinación motora o que la transmisión dopaminérgica sea compensada o adaptada a estos bajos niveles de DA. Sin embargo, pudimos observar que la combinación de ambos estimulantes mejora de la performance en el test de rotarod realizado 6 días luego del tratamiento.

Finalmente, del estudio de los cambios de expresión de los marcadores de terminales dopaminérgicos (TH y DAT) observamos que la disminución de los mismos por parte de MET se hace significativa recién a los 6 días posteriores al tratamiento. La administración de MOD no induce alteraciones en TH y DAT siendo MOD capaz de prevenir la disminución de estos marcadores por parte de MET.

En síntesis, los resultados de este capítulo confirman el efecto protector de MOD frente a las alteraciones inducidas por MET en hembras. La administración de MOD no mostró inducir toxicidad dopaminérgica en hembras, confirmando lo observado previamente en machos. Es por esta razón que, habiendo confirmado lo previamente observado en machos, decidimos continuar los experimentos siguientes de la tesis en ratones hembras.

---

# CAPÍTULO III

---

## A. INTRODUCCIÓN

### **Objetivo específico III: Estudio del efecto de modafinilo sobre la activación de genes de expresión temprana, la activación de las células de la glía y la expresión de genes relacionados con la apoptosis mediada por metanfetamina.**

El análisis de la activación de genes de expresión temprana (IEGs), como c-Fos, se utiliza comúnmente como herramienta para estimar el índice de activación neuronal y para la identificación de áreas que participan en el efecto de las drogas de abuso (Graybiel y cols., 1990b). Tanto MET como R-MOD inducen un aumento de la expresión de éstas proteínas en el estriado (Fiocchi y cols., 2009; Jedynak y cols., 2012).

El proto-oncogén *c-fos* codifica para la proteína c-Fos la cual posee una baja expresión en condiciones basales (Curran 1998) pero que aumenta su expresión de forma transitoria frente a estímulos externos relacionados con la división celular o de despolarización neuronal (Greenberg y cols., 1986; Morgan y Curran 1986; Sheng y Greenberg 1990). Este tipo de estimulación externa mediada por la activación de receptores de superficie induce la expresión de genes tanto de la familia Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) como la de genes de la familia Jun (c-Jun, JunB y JunD). La unión de las proteínas de la familia Fos con las de la familia Jun resulta en heterodímeros que componen al factor de transcripción AP-1 (Proteína activadora 1). Luego, este factor se une a sitios AP-1 del ADN presentes en promotores de genes que participan en procesos relacionados con la proliferación y la diferenciación celular (Franza y cols., 1988). El rol de la expresión de c-Fos puede resultar en eventos protóxicos o protectores dependiendo del dímero que forme. Por esta razón, el estudio de la expresión de c-Fos es útil para evaluar el grado de activación neuronal y no la función que cumple la expresión de este gen.

Por otro lado, la expresión de FosB/ $\Delta$ FosB se utiliza comúnmente para predecir cambios plásticos a nivel sináptico asociados con la sensibilización de la respuesta a determinadas conductas (Nestler y cols., 2001). Ante la exposición repetida a drogas de abuso se puede observar la aparición de isoformas modificadas de larga vida media de FosB, como  $\Delta$ FosB (35-37 kDa), las cuales tienden a acumularse para formar un complejo AP-1 de larga duración (Chen y cols., 1997; Nestler y cols., 2001).

$\Delta$ FosB carece del dominio C-terminal presente en FosB que es responsable de la rápida degradación de la proteína completa, otorgándole a esta variante truncada una mayor estabilidad (Chen y cols., 1997). Esta estabilidad permite que  $\Delta$ FosB pueda persistir elevada por más tiempo promoviendo cambios plásticos adaptativos de larga duración relacionados con el desarrollo de las conductas características de las adicciones (Nestler 2001). Si bien no se conoce el efecto de MOD sobre la expresión de FosB, se sabe que MET aumenta su expresión y que la misma parecería estar relacionada con la expresión de proteínas cuya función contribuye a la neuroprotección frente al daño inducido por MET (Kuroda y cols., 2010). Es por esta razón en este capítulo nos propusimos, entre otras cosas, estudiar el efecto de la administración de MOD junto con MET sobre la activación de genes de expresión temprana. Además, siendo que poco se sabe acerca del efecto de MOD sobre la inducción de la expresión de estas proteínas es que resulta un objetivo en si mismo indagar sobre esta cuestión.

Por otro lado, se sabe que la administración de un tratamiento neurotóxico con MET es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en el estriado. Esta respuesta se caracteriza por una fuerte activación de astrocitos y de células de la microglía (LaVoie y cols., 2004, O'Callaghan y Miller 1994, Thomas y cols., 2004). La astrogliía y la microglía forman parte de la neuroglía y son los tipos celulares predominantes en el cerebro de los *Homo sapiens*. Estas células se encargan de controlar el ambiente molecular local del encéfalo y son el sistema de defensa intrínseco del sistema nervioso central (Heneka y cols., 2010).

Los astrocitos pueden ser protoplasmáticos o fibrosos. Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran predominantemente en la sustancia gris y se encargan de dividirla en unidades estructurales o "dominios" relativamente independientes entre ellos (Bushong y cols., 2004). Cada astrocito establece su propio territorio dentro de los límites de sus propios procesos arborizados que contactan con sinapsis, neuronas y vasos sanguíneos (Heneka y cols., 2010). Este tipo de organización celular se encuentra presente tanto en humanos como en roedores pero difiere en el volumen de cada dominio (Nedergaard y cols., 2003, Oberheim y cols., 2009). En humanos resulta mayor el número de sinapsis las reguladas e integradas dentro de un mismo dominio astrogliial respecto de lo que se observa en el caso de los roedores (Halassa y cols., 2007).

Los dominios astrocíticos se relacionan entre ellos para formar los “sincitios astrogiales” mediante uniones comunicantes (gap junctions) ubicadas en la periferia de cada uno de sus procesos en el lugar donde se solapan los dominios. Estas uniones permiten el intercambio de un gran número de moléculas entre astrocitos incluidos los segundos mensajeros. Dentro de una misma estructura anatómica pueden coexistir varios sincitios astrogiales acoplados eléctricamente entre ellos o presentar poco o ningún acoplamiento eléctrico como es el caso de las redes astrogiales que componen “barriles” en la corteza sensorial del cerebro del ratón (Heneka y cols., 2010).

Los astrocitos que forman parte de la BHE conectan a las neuronas con sus capilares vecinos que liberan sustancias vasoactivas en respuesta a cambios de actividad neuronal (Heneka y cols., 2010, Oberheim 2009). Los astrocitos almacenan glucosa en forma de glucógeno y frente a incrementos de actividad neuronal, lo convierten en lactato, sustrato energético para las neuronas. Los astrocitos también se encargan de conservar el gradiente electroquímico en las neuronas al mantener los niveles extracelulares de  $[K^+]$  y de compensar los cambios de osmolaridad en la sinapsis regulando el pasaje de agua por medio de acuaporinas. Finalmente, estas células se encargan de regular los niveles extracelulares de glutamato evitando que su exceso desencadene procesos neurotóxicos (Heneka y cols., 2010). De hecho, el glutamato es recaptado por el astrocito a través del transportador de aminoácidos excitatorios (EAAT) en un proceso regulado por el amoníaco (Heneka y cols., 2010), molécula que se encuentra aumentada en tratamientos tóxicos con MET presumiblemente a causa de la hepatotoxicidad inducida por ella (Halpin y Yamamoto 2012).

Junto con el terminal de la neurona presináptica y la membrana de la neurona postsináptica, los astrocitos componen la “sinapsis tripartita” (Perea y cols., 2009). Éstos responden ante ingresos de calcio a la célula liberando gliotransmisores como glutamato, ATP, D-serina, GABA, taurina y demás moléculas para regular la eficacia de la sinapsis (Heneka y cols., 2010). Los astrocitos son elementos clave en la génesis, la maduración y el mantenimiento de la sinapsis y protegen a las células de eventos oxidativos regulando las respuestas inflamatorias y la producción de antioxidantes como el glutatión (Heneka y cols., 2010, Pfeifer 2009).



Dentro de la neuroglía se encuentran las células de la microglía (macrófagos residentes en el SNC). Estas células acceden al cerebro durante el periodo postnatal temprano y son capaces de autorrenovarse sin necesidad de ser reemplazadas por monocitos circulantes (Ajami y cols., 2007). Actúan como células presentadoras de antígenos constituyendo la primera línea de defensa del SNC frente a patógenos y sensando el daño tisular (Hanisch y Kettenmann 2007). En estado de reposo, las células de la microglía poseen un soma pequeño y múltiples procesos finos (morfología ramificada) mientras que en estado activo adquieren morfología de células "ameboideas" con capacidad de migrar hacia el sitio de la injuria para fagocitar los desechos celulares. La microglía activada secreta citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) junto con especies reactivas del oxígeno, radicales libres y óxido nítrico (Felter y Amigorena 2005, Gomes-Leal 2005, Hanisch y Kettenmann 2007).

Cada célula de la microglía también delimita dominios a los que se encarga de escanear continuamente a través de sus procesos (Nimmerjahn y cols., 2005). La microglía se activa en respuesta al daño neuronal o frente a estímulos provenientes de los astrocitos (Kreutzberg 1996, Nakajima y cols., 2007, Shih y cols., 2006). A su vez, la astrogliía puede tanto activar como modular la actividad de la microglía contribuyendo a generar o disminuir su citotoxicidad (Ramirez y cols., 2005, Von Bernhardi y Eugenin 2004). Al mismo tiempo, la microglía puede intervenir en la activación y la proliferación de los astrocitos (Giulian y Baker 1985), modular la expresión de enzimas antioxidantes en las células de la astrogliía (Röhl y cols., 2008) e inhibir las uniones comunicantes mediante las citoquinas proinflamatorias que libera (Meme y cols., 2006). De este modo, la inflamación puede ser iniciada por la activación de cualquiera de estas células convirtiéndose en un proceso complejo de activación recíproca de un tipo celular sobre el otro.

Frente al daño neuronal también son reclutados los macrófagos periféricos (microglía de tipo M2) que acceden al SNC en una instancia tardía a través del plexo coroideo para dar fin a la respuesta pro-inflamatoria de la microglía residente e iniciar la reparación del daño (Heneka y cols., 2010, Shechter y cols., 2009). A diferencia de la microglía residente, la microglía de tipo M2 libera citoquinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10). Éste fenotipo se adquiere frente a la exposición de las células al atravesar el plexo coroideo por exposición a proteínas de la matriz extracelular y condroitina sulfato (Rolls y cols., 2008).

MET produce la activación de los astrocitos (Bowyer y cols., 1994, O'Callaghan y Miller 1994) y de las células de la microglía (LaVoie y cols., 2004, Thomas y cols., 2004) tanto en modelos animales (Thomas y cols., 2004) como en humanos (Kitamura y cols., 2010, Sekine y cols., 2008). MET también induce la liberación de citoquinas inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) por parte de la microglía (Flora y cols., 2002, Gonçalves y cols., 2008, Nakajima y cols., 2004) cuya producción excesiva puede derivar en deficiencias conductuales ya que promueve la neurotoxicidad (Block y Hong 2007).

Se cree que la activación de la glía inicialmente contribuye a proteger el tejido nervioso de la injuria ya que la astrogliosis es necesaria para limitar el tejido dañado y para la recuperación de la función neuronal. Del mismo modo, la microglía activada sería necesaria para llevar a cabo las respuestas inmunes y para la remoción de los desechos provenientes de la muerte celular (Hanisch y Kettermann 2007, Ransohoff y Perry 2009). No obstante, una sobreactivación de estas células puede resultar en un desbalance entre la neuroprotección y la neurotoxicidad y producir la muerte neuronal (Giaume y cols., 2007).

Finalmente, MET induce apoptosis en las células del estriado de ratones a través de la vía intrínseca mitocondrial (Jayanthi y cols., 2004). Las proteínas de la familia Bcl-2, subfamilia BAX, forman parte de esta vía y el aumento de su expresión deriva en la formación de un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de hidrolasas y caspasas desde el espacio intermembrana al citosol desencadenando la muerte celular. *In vivo*, la proteína BAX puede formar homodímeros o heterodímeros con la proteína Bcl-2 (proteína anti-apoptótica). La sobreexpresión de BAX neutraliza la actividad del represor de la apoptosis Bcl-2, siendo el balance entre la expresión de estas dos proteínas el determinante entre la supervivencia y la muerte celular por apoptosis (Oltvai y cols., 1993).

En síntesis, para responder a la pregunta sobre si MOD es capaz de prevenir los eventos inflamatorios y pro-tóxicos desencadenados por el tratamiento con MET nos propusimos: a) Investigar el efecto particular de MOD y de la combinación de ambos estimulantes sobre la expresión de genes de expresión temprana (IEGs); b) evaluar si el efecto protector de MOD involucra modificaciones sobre la activación de células de la glía y c) estudiar los cambios en los niveles de expresión de las proteínas BAX (pro-apoptótica) y Bcl-2 (anti-apoptótica) en el estriado.

## B. METODOLOGÍA

### I. Animales

Según lo detallado en el **capítulo II**.

### II. Protocolo de administración de drogas.

Según lo detallado en el **capítulo II**.

### III. Técnicas histoquímicas

#### a. Obtención del material histológico

Se procedió del mismo modo como fue descrito en el capítulo II. Luego de extraídos, fijados y posteriormente separados los hemisferios cerebrales, uno de los hemisferios fue crioprotectado en sacarosa 30% PB 0,1M durante 48 horas Este hemisferio fue utilizado en el capítulo II para la realización de técnicas histoquímicas y en este capítulo para la inmunohistoquímica de GFAP. El otro hemisferio permaneció en una solución de PBS 0,1M hasta el momento de ser seccionado en rodajas de 50  $\mu$ m coronales con vibrátomo y fue utilizado para el estudio histoquímico de ILB-4.

#### b. Inmunohistoquímica colorimétrica para GFAP, c-Fos y FosB.

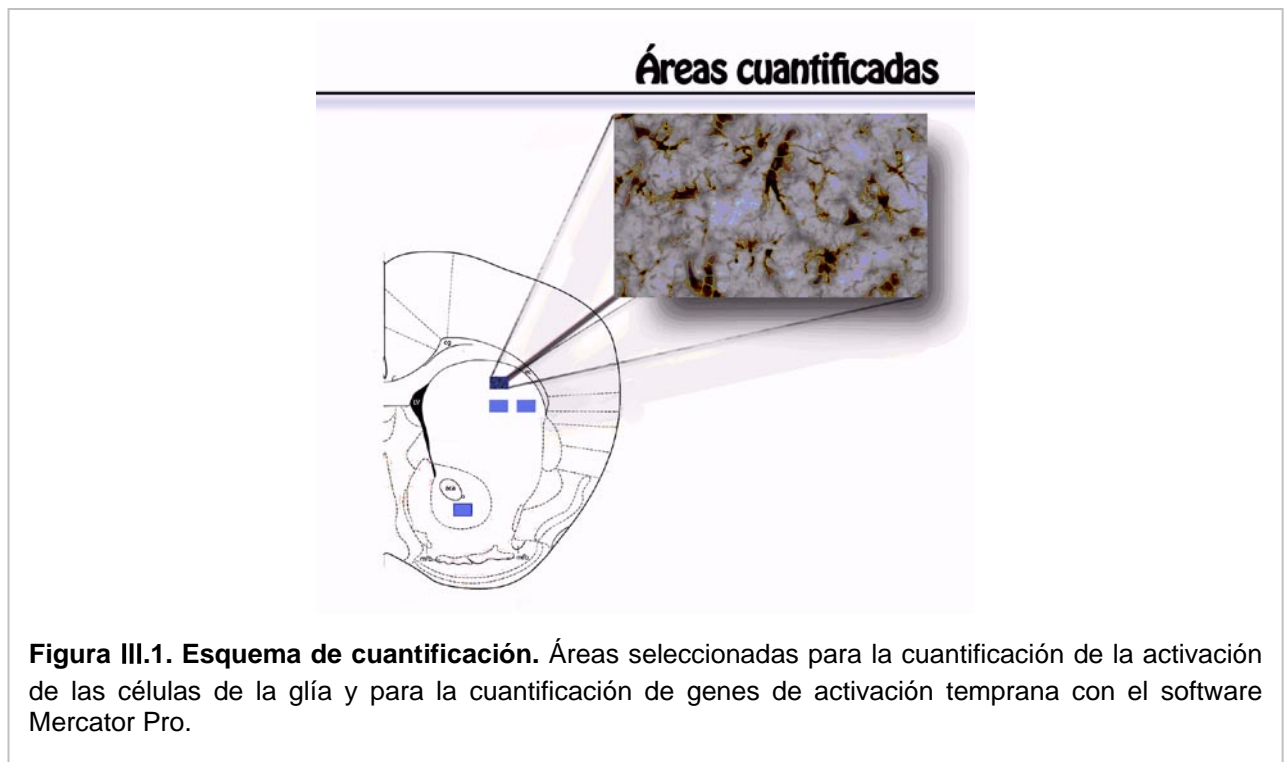
Se realizó el mismo procedimiento utilizado para la detección de TH con modificaciones. Para la detección de GFAP (proteína fibrilar glial) el bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó con  $H_2O_2$  al 3% debido a que los astrocitos poseen mayores concentraciones endógenas de esta enzima. La incubación de las rodajas se realizó en una solución de anticuerpo anti-GFAP producido en conejo 1:500 (Sigma Aldrich) y se procedió al revelado de la marca siguiendo el mismo procedimiento explicado para TH (ver **capítulo I**).

Para la determinación del número de células que expresan los genes de expresión temprana c-Fos o FosB los cortes fueron conservados en PFA 4% (en PB 0,1M) hasta el momento de realizar la técnica de inmunohistoquímica. Los cortes fueron lavados durante 30 minutos con una solución de HCl 2M a 37°C seguida de un lavado con una solución de ácido bórico 0,1M durante 10 minutos a temperatura ambiente con el propósito de efectuar la exposición antigénica. Luego la técnica se continuo del mismo modo en que fue descrita

para la marcación de TH explicada en el capítulo I exponiendo los cortes a una solución de anticuerpo primario anti c-Fos o anti-FosB (1:800, Sigma Aldrich) según fuese el caso.

### c. Cuantificación del área inmunorreactiva para GFAP

Se realizó bajo microscopio con la ayuda del software de mapeo Mercator Pro (Explora Nova, La Rochelle, Francia) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse 50i). El área inmunorreactiva fue determinada en de 400x distribuidos a lo largo del estriado dorsal (236 x 140  $\mu\text{m}^2$  cada uno) como se muestra en la **Figura III.1**. Se utilizó la herramienta umbral de color para diferenciar la marca específica del fondo y se calculó el porcentaje de área inmunorreactiva promediando los valores obtenidos para cada animal.



### d. Cuantificación del número de neuronas positivas para c-Fos o FosB

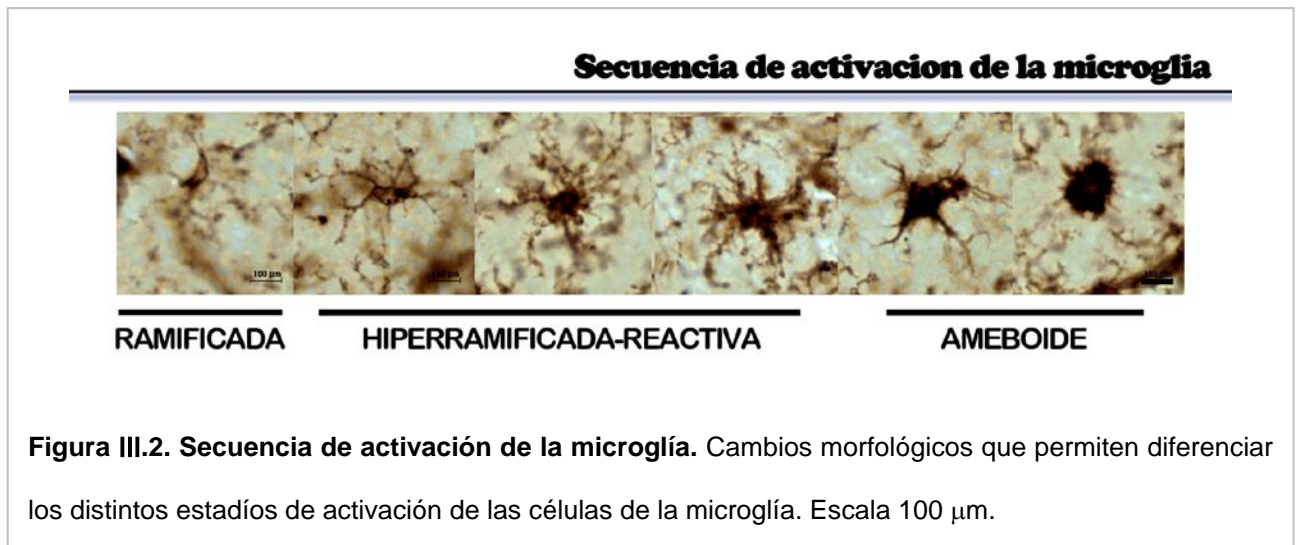
Se realizó bajo microscopio con la ayuda del software de mapeo Mercator Pro (Explora Nova, La Rochelle, Francia) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse 50i). El número de núcleos positivos para c-Fos o FosB fue determinado en 4 sondas de 236 x 140  $\mu\text{m}^2$  cada una, distribuidas a lo largo del StLd (3 sondas) y el NAcc (1 sonda) como se muestra en la **Figura III.1**.

#### e. Histoquímica colorimétrica para isolectina-B4 (ILB4)

La tinción para las células de la microglía se realizó sobre cortes fijados de 50µm de espesor con la lectina ILB4 conjugada directamente con la enzima peroxidasa según el método desarrollado por Streit (1999). La lectina ILB4 tiñe selectivamente la microglía en el sistema nervioso central (Ayoub y Salm, 2003; Thomas y cols., 2004) no siendo detectada en otras células de la glía como astrocitos y oligodendrocitos (Streit y Kreutzberg 1987). Se procedió al lavado y bloqueo con una solución de buffer fosfato salino 0,1M (PBS, pH 7.2) conteniendo 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos y luego lavados en PBS 0.1% Tritón X-100 durante 30 minutos. Los cortes se incubaron con ILB4 conjugada con la peroxidasa de rábano HRP (10 µg/ml en 0.1% Tritón X-100) por 16 horas a 4°C. El exceso de ILB4 fue removido mediante lavados y luego se procedió al revelado con DAB en 0.015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### f. Cuantificación de la activación de la microglía

Se realizó bajo microscopio con la ayuda del software de mapeo Mercator Pro (Explora Nova, La Rochelle, Francia), acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse 50i). Se utilizó un sistema semiautomático de conteo que permite determinar la posición de las células contadas dentro de los campos de 400x elegidos según el caso (236 x 140 µm de área) ubicados dentro del estriado como se muestra en la **Figura III.1**. Las células de la microglía contadas fueron clasificadas de acuerdo con su morfología en: ramificadas, hiperramificadas-reactivas o ameboideas como se muestra en la **Figura III.2**. La microglía con morfología ramificada fue considerada como microglía en estado de reposo mientras que las células hiperramificadas-reactivas y ameboideas se agruparon en la categoría microglía activada (Streit, 1999). Los resultados fueron expresados como porcentaje de células en estado de reposo o activado frente al total de las células contadas.



#### IV. Técnica de Plata

##### a. Obtención del material histológico

Los animales fueron anestesiados con ketamina (0,5 ml/kg i.p, Holliday-Scott) y xilazina (1,4 ml/kg i.p., Kensol-König) y perfundidos intracardiamente con 20ml de solución de lavado (Glucosa 0,4 %, Sacarosa 0,8 % y Cloruro de sodio 0,8 %) seguido de 80 ml de PFA al 4% en buffer borato 0,2M pH = 7. Los cerebros permanecieron en el cráneo del animal por un periodo de 12 horas a 4°C, pasados los cuales fueron crioprotegidos en una solución de sacarosa en agua al 30% hasta el momento de ser seccionado en rodajas sagitales de 40  $\mu\text{m}$  con micrótopo. Para todos los pasos de esta técnica se utilizó agua de calidad miliQ.

##### b. Técnica Cupro-Amino-Argéntica

Esta tinción se utiliza comúnmente para visualizar fenómenos degenerativos irreversibles y en nuestro caso será útil para investigar el curso temporal de la degeneración inducida por MET. La tinción de plata fue realizada según el protocolo publicado por De Olmos 1994. Inicialmente se realizó una preimpregnación de 2 h en una solución de preimpregnación [AgNO<sub>3</sub> 100 mg, ácido  $\alpha$ -amino-n-butirico 53 mg, alanina 46 mg, 2 ml de 0.5% CuNO<sub>3</sub>, 0.2ml de 0.5 % CdNO<sub>3</sub>, 1.5ml de 0.5% LaNO<sub>3</sub>, 0.5 ml de rojo neutro al 0.5 %, 1 ml de piridina, 1 ml de trietanolamina, 2 ml isopropanol y 100 ml de agua a 50 °C]. Luego de la pre-impregnación las secciones fueron lavadas con acetona y expuestas a la solución de impregnación [412 mg AgNO<sub>3</sub>, 4ml de etanol, 0.05 ml de acetona, 3 ml de 0.4% LiOH, 0.65 ml de NH<sub>4</sub>OH, 5 ml de agua por un periodo de 50 minutos a temperatura ambiente]. En un paso posterior las secciones se incubaron en una

solución reductora [formaldehído/ácido cítrico] y detenida con ácido acético al 0,5 % a los 25 minutos. El blanqueamiento se realizó en dos pasos para eliminar los depósitos inespecíficos de plata del tejido, primero en ferricianuro de potasio al 6% y luego en permanganato de potasio al 0.06 % durante 20 segundos. Se realizó un lavado y se procedió a la estabilización de la marca con tiosulfato de sodio al 2 %, le sucedió otro lavado y se realizó la fijación (Fijador Kodak diluido 1:6 en agua) durante 1 minuto. Finalmente se montaron las secciones, se dejaron secar al aire, se deshidrataron y luego de un paso por Xileno fueron cubiertas con medio de montaje (DPX, Flucka).

#### V. Determinación de BAX y Bcl-2 por Western Blot

Los animales fueron sacrificados 16 horas después del tratamiento. Se procedió a la disección del estriado y los tejidos fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser procesados para Western Blot. Se realizó un homogenato en una solución de 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 5  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina y 5  $\mu\text{g/ml}$  de aprotinina. Del sobrenadante obtenido luego de la centrifugación del homogenato se determinó la concentración proteica mediante al método de cuantificación de proteínas de Lowry. La muestra a sembrar fue preparada diluyendo una alícuota de homogenato con igual volumen de buffer de siembra (4% SDS, 20% glicerol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 125 mM Tris, pH 6.8), y hervido a  $100^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Luego de la siembra se separaron las proteínas (50-100  $\mu\text{g/calle}$ ) mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Una vez separadas, fueron transferidas a una membrana de PVDF. Las membranas conteniendo las proteínas se incubaron con las soluciones de anticuerpo anti-BAX policlonal producido en conejo (Santa Cruz Biotechnology) o con la solución de anticuerpo contra Bcl-2 (RyD Systems, Minneapolis, MN), ambos diluidos 1:500. Las membranas fueron posteriormente incubadas en una solución de anticuerpos dirigidos contra la IgG de conejo unidos a HRP y reveladas por electroquimioluminiscencia (reactivos de Amersham, Piscataway, NJ). Finalmente, luego del bloquear la enzima HRP conjugada al anticuerpo secundario, se incubaron las membranas con el anticuerpo monoclonal anti  $\alpha$ -tubulina (1:3000, Sigma, St. Louis, MO) con el objeto de realizar el control de carga de la proteína sembrada en el gel.

#### VI. Análisis estadístico

Idem capítulo II.

## C. RESULTADOS

Para poder cumplir con los objetivos de este capítulo nos planteamos:

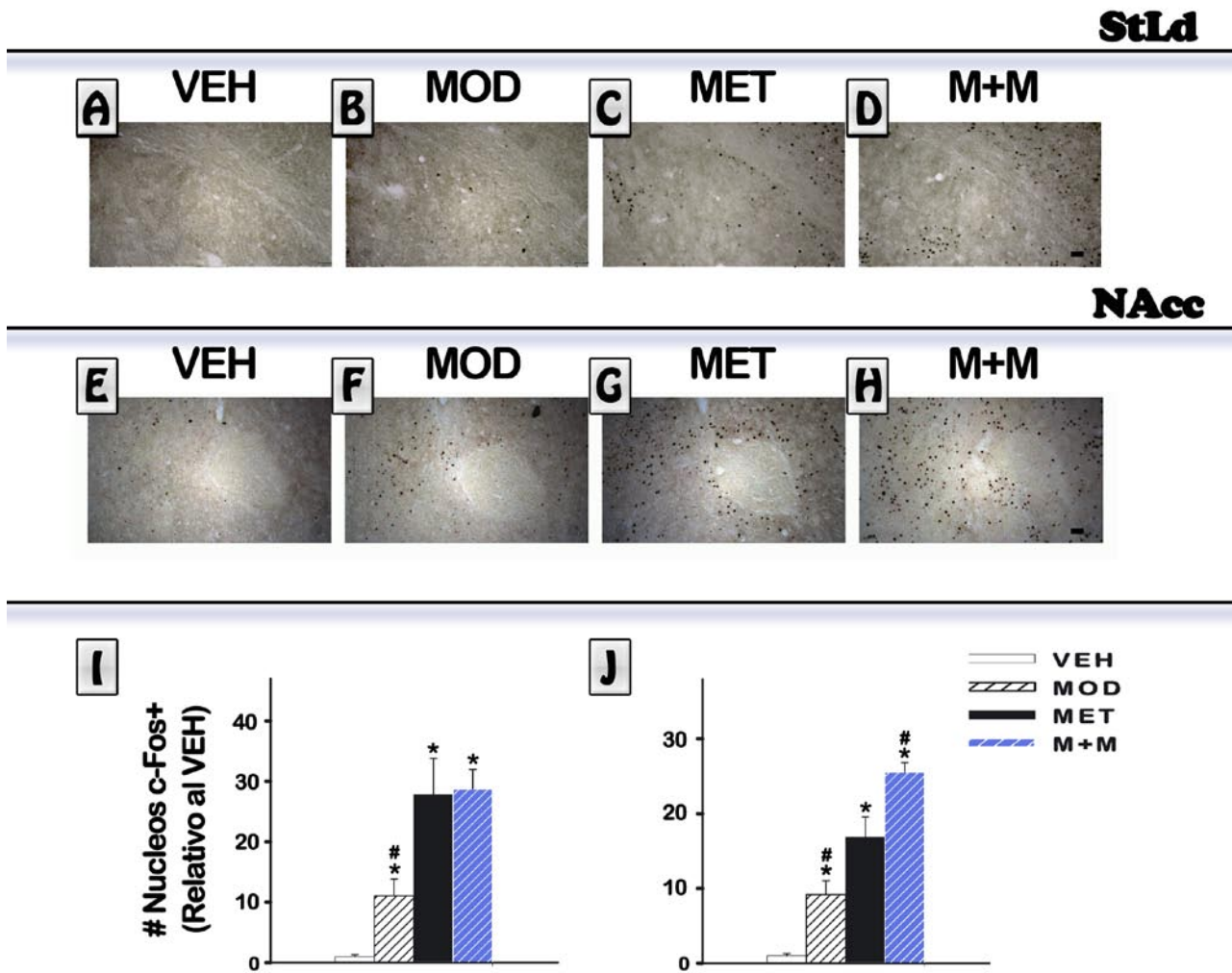
### I. Estudiar de la activación de genes de expresión temprana en el estriado

#### a. *Activación de c-Fos en el estriado.*

El análisis de la activación de c-Fos se utiliza comúnmente como herramienta para estimar el índice de activación neuronal y para la identificación de áreas que participan en el efecto de las drogas de abuso (Graybiel y cols., 1990b). Para llevar a cabo este propósito los animales fueron sacrificados 1 hora después de la última inyección de MET y cuantificó el número de neuronas positivas para c-Fos en el StLd y en el NAcc core en los cerebros de los animales tratados (**Figura III.3**). Como puede observarse en la figura, donde los puntos negros corresponden a la marca positiva:

- En el StLd y en el NAcc se observó la inducción de la activación de c-Fos cuando los animales fueron tratados con cada uno de los estimulantes. Sin embargo, el efecto fue significativamente mayor luego de la administración de MET.
- Por otro lado, la administración de MOD no solo no previno la inducción de c-Fos por parte de MET sino que incluso, en el NAcc, la activación resultó aún mayor para el grupo combinado M+M que para el grupo MET.

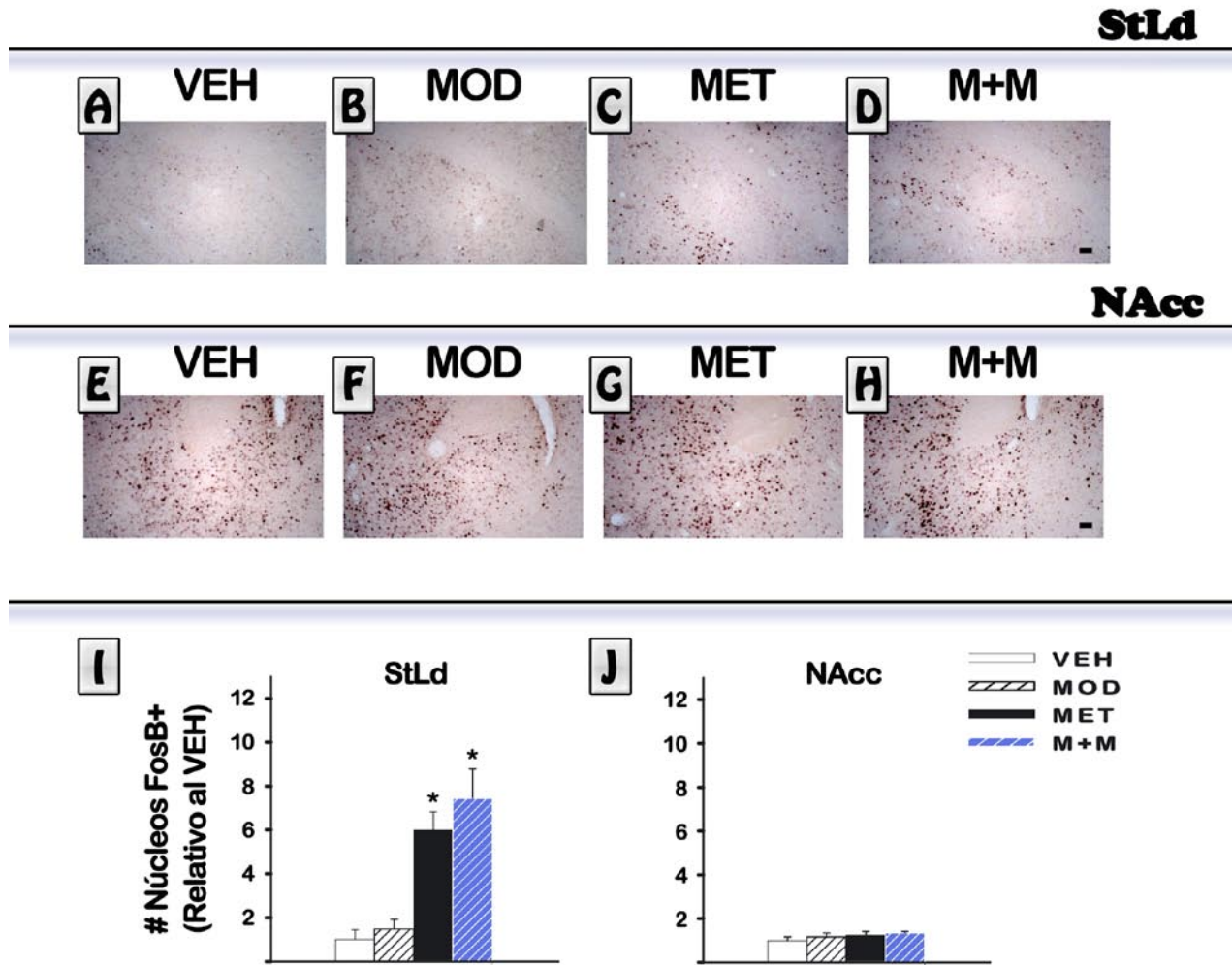




**Figura III.3. Efecto de la administración de MOD junto con un binge de MET en la activación de c-Fos.** En el panel superior se muestran las fotos representativas de la activación de c-Fos en el StLd (A-D) y en el NAcc (E-H). Los resultados de la cuantificación se presentan como el número medio de núcleos positivos para c-Fos  $\pm$  SEM ( $n= 6-8$ ) para el estriado dorsal (I) y el NAcc (J). ANOVA de una vía seguido de la prueba LSD de Fisher \*  $p<0.05$  vs. VEH, #  $p<0.05$  vs. MET, &  $p<0.05$  vs. MOD. Escala (A-H): 50 $\mu$ m.

**b. Activación de FosB en el estriado.**

Para evaluar si MOD era capaz de modular la expresión de FosB en el NAcc y en el StLd y de prevenir la expresión de este marcador cuando se lo administra junto con MET (Figura III.4). Los animales fueron sacrificados 1 hora luego de la última inyección de MET (mismo tiempo que para c-Fos).



**Figura III.4. Efecto de la administración de MOD junto con un binge de MET en la activación de FosB.** Se muestran las fotos representativas de la activación de FosB en el StLd (A-D) y en el NAcc (E-H). Los resultados de la cuantificación se presentan como número promedio de núcleos positivos para FosB  $\pm$  SEM (n= 6-8) en las respectivas áreas (I-J). ANOVA de una vía seguido de la prueba LSD de Fisher \* $p < 0.05$  vs. VEH, # $p < 0.05$  vs. MET, Escala (A-H): 50 $\mu$ m.

Como muestra la figura:

- A diferencia de lo observado para c-Fos, únicamente los grupos que recibieron MET mostraron un aumento de núcleos FosB positivos en el StLd.
- MOD no indujo la expresión de FosB en el estriado ni fue capaz de prevenir la activación inducida por MET.
- No se observaron cambios en la expresión de FosB en el NAcc con ninguno de los tratamientos administrados.

II. Analizar la activación de las células de la glía:

a. Activación de la Astroglia

La astrogliosis se produce como consecuencia de los daños inducidos al SNC y se caracteriza principalmente por la hipertrofia de los astrositos la que cursa con el aumento de tamaño celular, la presencia de procesos alargados y finos y el aumento del contenido de filamentos gliales como GFAP (Norton y cols., 1992; O'Callaghan 1991). Por esta razón en esta sección realizamos la cuantificación del área inmunorreactiva para GFAP como se muestra en la Figuras III.5 a partir de las fotos obtenidas (Figura III.6):

- La activación de las células de la astroglia en el StLd por parte de MET se fue incrementando con el tiempo, alcanzando valores máximos a las 48 horas
- Se observó un leve aumento del área inmunorreactiva para GFAP en el StLd a las 16 y a las 48 horas posteriores a la administración de MOD.
- La combinación de ambos estimulantes previno la activación astrogliál inducida por cada uno de los estimulantes evaluados por separado.
- No se evidenció una activación significativa de GFAP para ninguno de los tratamientos en el NAcc a los 6 días posteriores al tratamiento.

**GFAP**

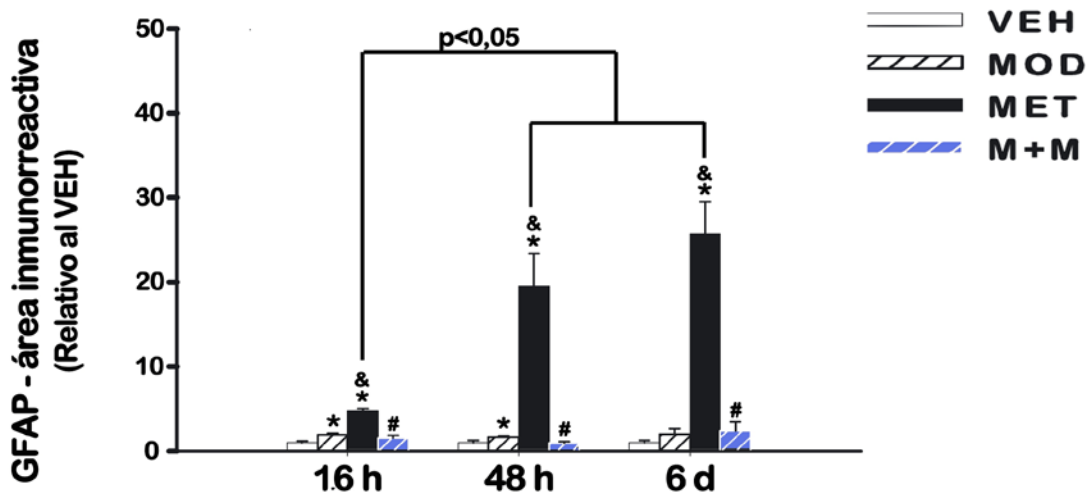


Figura III.5. Efecto de MOD sobre la activación de la astroglia a distintos tiempos posteriores al tratamiento con MET. Los resultados se expresan como porcentaje de área inmunorreactiva (relativa a VEH) ± SEM (n= 5-8). ANOVA de una vía seguido de la prueba LSD de Fisher \* p<0.05 vs. VEH, # p<0.05 vs. MET, & p<0,05 vs MOD.

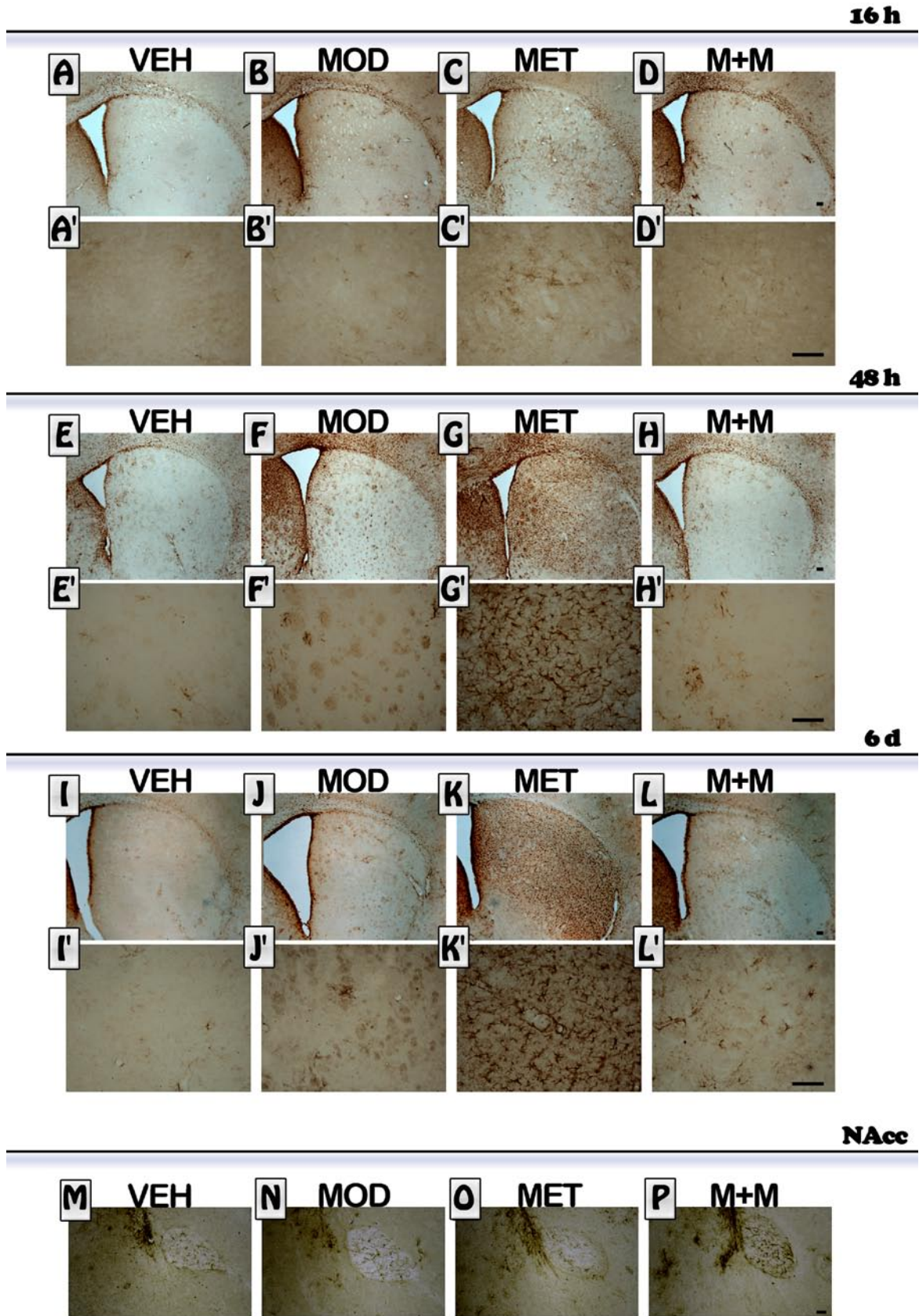


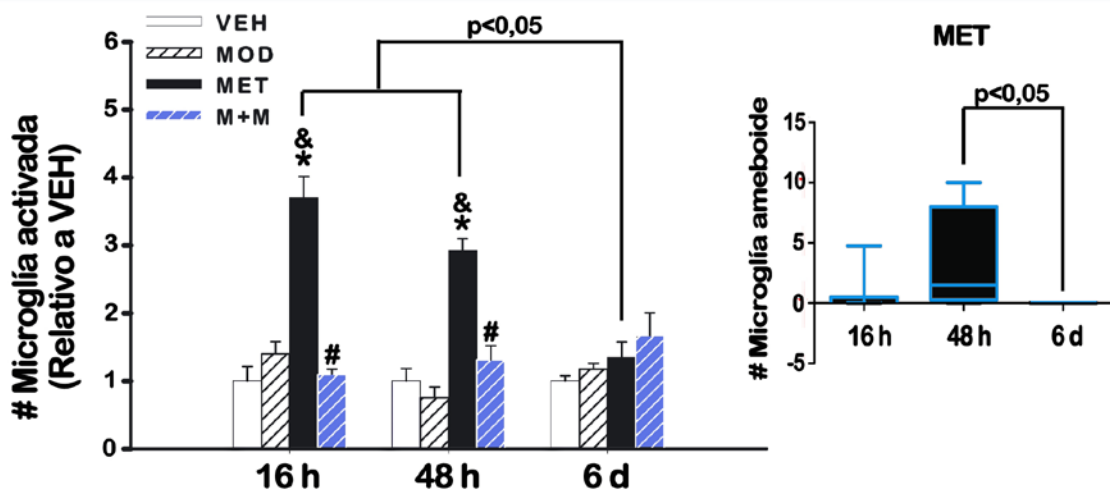
Figura III.6. Efecto de MOD sobre la activación de la astrogliá a distintos tiempos posteriores al tratamiento con MET. Imágenes representativas del efecto del tratamiento sobre la inmunorreactividad para GFAP en el StLd (A-L) a las 16 horas (A-D), 48 horas. (E-H) y a los 6 días (I-L) posteriores a MET. En el panel inferior se muestran las imágenes del NAcc (M-P). Escala: 100 µm.

**b. Activación de la Microglía**

El estudio de la activación de la microglía se realizó con la tinción histoquímica de Lectinas (Streit, 1987). La discriminación del grado de activación según la morfología observada y su cuantificación se realizó con el software Mercator Pro (Exploranova, Francia) como se muestra en las Figuras III.7 y III.8:

- A partir de las 16 horas ya se comenzó a evidenciar un cambio de morfología de las células hacia fenotipos activados en los animales tratados con MET. De forma interesante, luego de 6 días del tratamiento las células se encuentran nuevamente en estado de reposo.
- MOD no indujo la activación de la microglía y fue capaz de prevenir la activación de la microglía por parte de MET.
- No se evidenció un cambio significativo en la morfología de la microglía para ninguno de los tratamientos en el NAcc estudiada a las 48 horas posteriores al tratamiento.

**ILB-4**



**Figura III.7. Efecto de MOD sobre la activación de la microglía luego de un tratamiento con MET.** Los resultados se expresan como número de células activadas (relativa a VEH) ± SEM (n= 5-8) en el StLd de ratones hembra que recibieron el tratamiento. ANOVA de una vía seguido de la prueba LSD de Fisher. \* p<0.05 vs. VEH, # p<0.05 vs. MET, & p<0,05 vs MOD. En el panel derecho se muestra el número de células con fenotipo ameboideo presentes en el grupo MET. Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn.

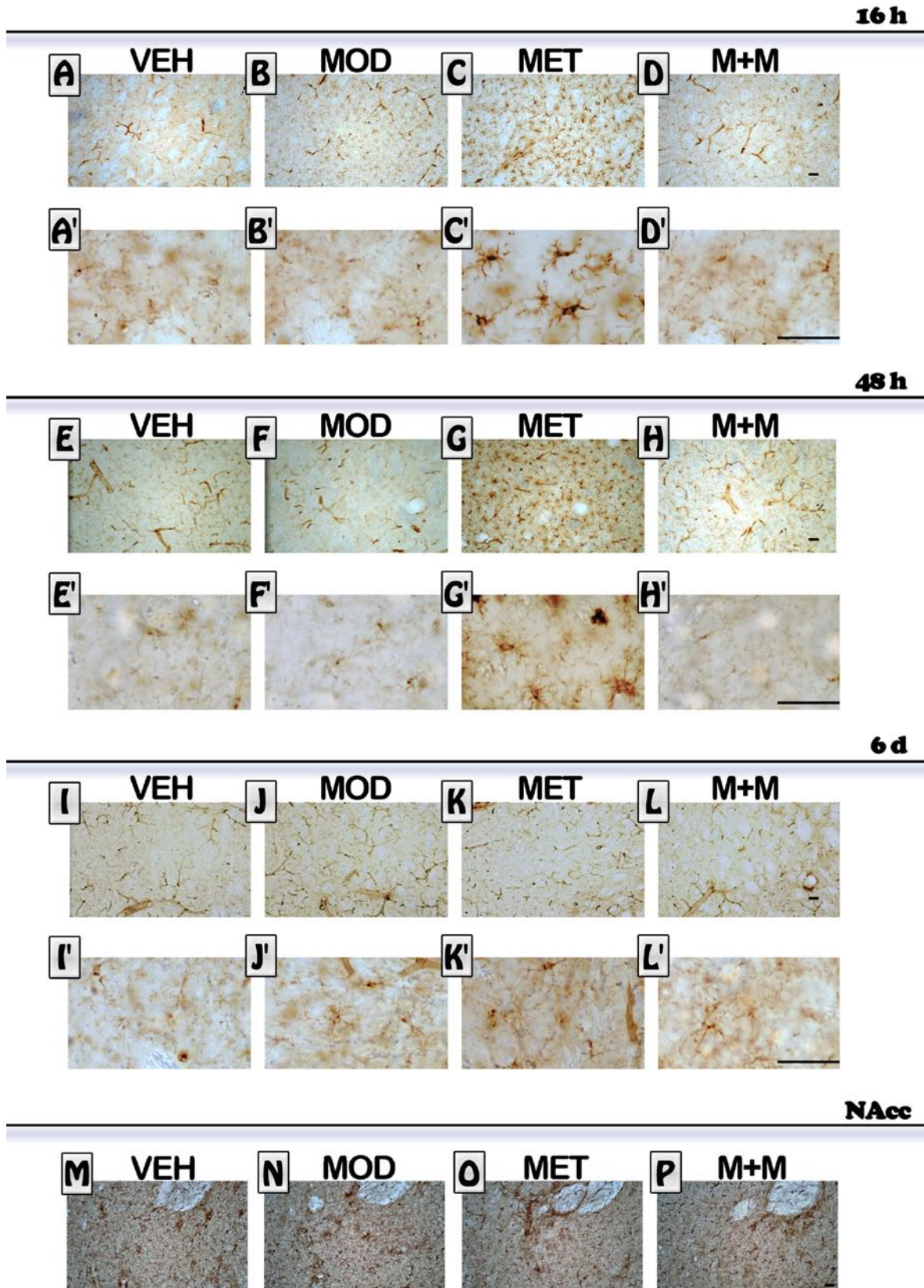


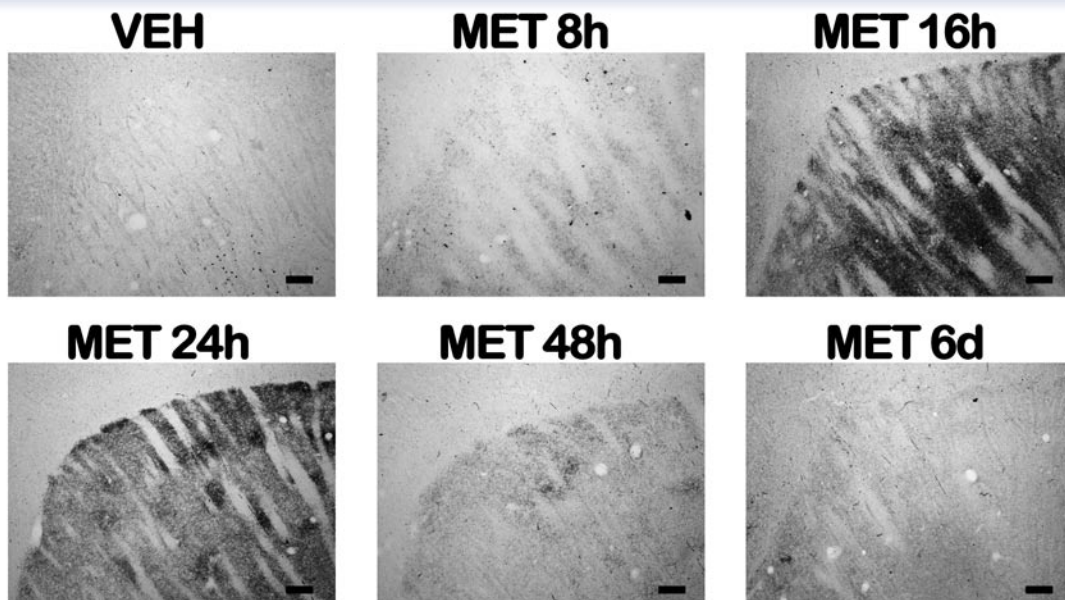
Figura III.8. Efecto de MOD sobre la activación de la microglía a distintos tiempos posteriores al tratamiento con MET. Imágenes representativas del efecto del tratamiento sobre la marcación para ILB-4 en el StLd (StLd A-L) a las 16 horas (A-D), 48 horas (E-H) y 6 días (I-L) posteriores a MET. En el panel inferior se muestran las imágenes del NAcc (M-P). Escala: 50µm.

III. Caracterizar el efecto de la administración de MOD sobre la expresión de proteínas relacionadas con eventos apoptóticos inducida por MET en el estriado:

a. *Estudiar el curso temporal de la degeneración terminal inducida por MET en el estriado según la técnica Amino-Cupro-Argéntica*

Con el fin de determinar el curso temporal de la degeneración terminal con MET se realizó la técnica Amino-Cupro-Argéntica (de Olmos y cols., 1994) a las 8, 16, 48 horas y 6 días posteriores a la administración de MET (Figura III.9). Dada la sensibilidad de esta tinción pudimos evaluar cambios neurodegenerativos inducidos por MET para elegir los tiempos en los cuales posteriormente realizaremos el análisis de la expresión de las proteínas apoptóticas.

### Curso temporal de la degeneración terminal



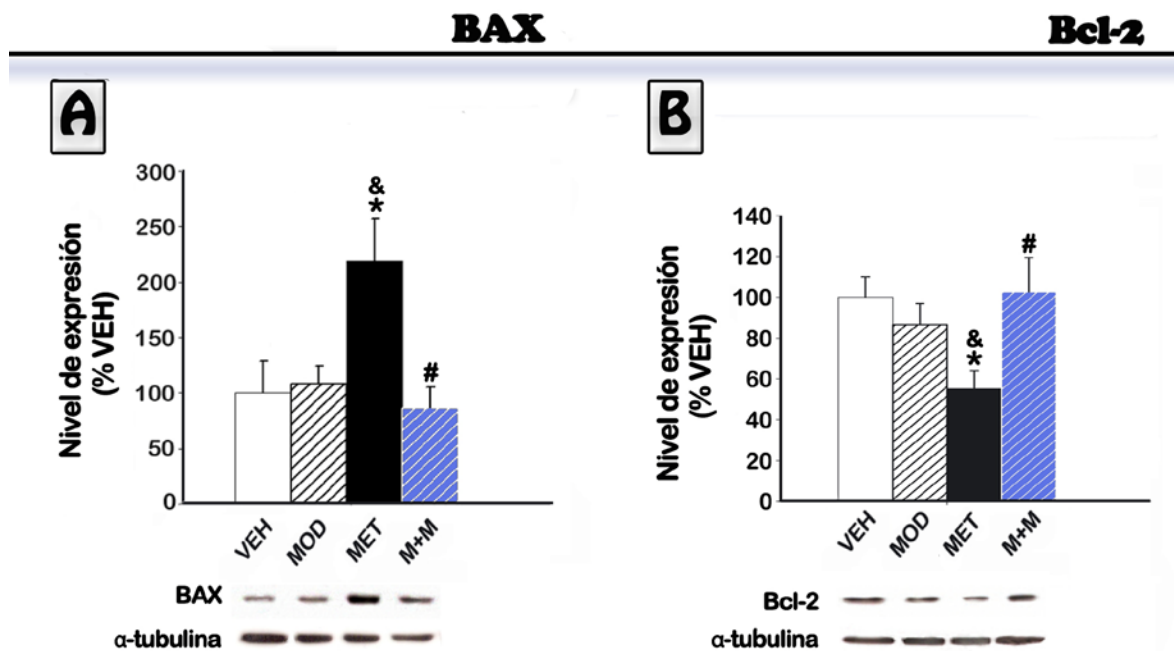
**Figura III.9. Curso temporal de la degeneración de terminales que inervan el estriado inducida por MET.** Se muestran imágenes representativas de cada uno de los tiempos evaluados. Escala: 100 $\mu$ m.

Como puede observarse en la figura el tiempo de máximo depósito de plata en las terminales que inervan el estriado se encuentra comprendido entre las 16 y las 24 horas posteriores a la administración de un *binge* tóxico de MET, razón por la cual se eligió el tiempo de 16 horas después de la administración de MET para proceder al estudio de la expresión de genes relacionados con eventos apoptóticos en el estriado.

**b. Caracterizar el efecto de la administración de MOD sobre la expresión de BAX y Bcl-2 inducida por MET en el estriado:**

Dado que MET induce apoptosis en las células del estriado de ratones nos propusimos evaluar si MOD puede contrarrestar el efecto pro-apoptótico de MET en el estriado mediante el estudio de cambios en los niveles de expresión de las proteínas BAX (pro-apoptótica) y Bcl-2 (anti-apoptótica). Para ello los ratones fueron sacrificados a las 16 horas posteriores al tratamiento y el estudio de la expresión de BAX y Bcl-2 se realizó mediante la técnica de Western blot. Como puede observarse en la **Figura III.10**:

- MET indujo el aumento de la expresión de la proteína pro-apoptótica BAX y la disminución de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2.
- MOD no alteró la expresión ni de BAX ni de Bcl-2 y además fue capaz de prevenir la desregulación en la expresión de estas proteínas inducida por MET



**Figura III.10. Efecto de MOD sobre los cambios en los niveles de expresión de las proteínas BAX y Bcl-2 a las 16hs luego de un binge de MET.** Los resultados se muestran como niveles de expresión de las proteínas BAX (A) y Bcl-2 (B) normalizados a la expresión de alfa-tubulina (en valores porcentuales a VEH)  $\pm$  SEM (n= 5-9). ANOVA de una vía seguido de la prueba LSD de Fisher \*  $p < 0.05$  vs. VEH, #  $p < 0.05$  vs. MET, &  $p < 0,05$  vs MOD.



## D. DISCUSIÓN

Las vías dopaminérgica nigroestriatal y mesolímbica son el centro de interés en el estudio de las adicciones. Dentro de la vía nigroestriatal, el estriado dorsal (CPu) es comúnmente vinculado a mecanismos adaptativos que participan en el desarrollo de la sensibilización conductual y el consumo compulsivo de la droga (Gerdeman y cols., 2003; Robbins y Everitt 2002). Por otro lado, en el estriado ventral, el NAcc participaría en el efecto hiperlocomotor de los estimulantes (Di Chiara 2002; Sellings y Clarke 2006).

Por un lado, siendo c-Fos considerado un marcador de la activación neuronal, el aumento de la expresión de c-Fos en el NAcc podría estar relacionado con el aumento de la actividad locomotora y el aumento de c-Fos en el estriado dorsal con la expresión de estereotipias. En nuestro caso, y conforme con lo reportado por Jedynak y cols., (2012), observamos un aumento de neuronas que expresan c-Fos luego de la administración de MET tanto en el StLD como en el NAcc. Así mismo, MOD incrementa la expresión de c-Fos en el estriado, hecho que coincide con lo observado por Fiocchi y cols., (2009) al administrar armodafinil (R-MOD) a ratas. Sin embargo, ellos no evidenciaron un aumento significativo de la expresión de c-Fos en el NAcc como lo hicimos nosotros posiblemente debido a que nosotros realizamos el tratamiento con la mezcla racémica de los esteroisómeros de MOD, a la diferencia de especies, o a que nosotros administramos MOD en dos oportunidades y no en una sola como lo hicieron ellos.

Siendo la activación de la vía directa (D1) necesaria para la expresión de estereotipias y el aumento de expresión de c-Fos y FosB por parte de MET (Beauvais y cols., 2010, Chartoff y cols., 2001), el aumento del número de neuronas activadas podría estar relacionado con una mayor liberación de DA en las áreas estudiadas. En este sentido, Zolkowska y cols., (2009) sugirieron que para alcanzar valores comparables de locomoción, MOD induce una menor liberación de DA en el NAcc que MET. Estos autores también advirtieron que la preadministración de MOD atenuaba la liberación de DA inducida por MET pero no la prevenía. Dado que la administración de MOD junto con MET no sería suficiente para prevenir la activación de c-Fos por parte de MET (grupo M+M), lo que podría estar sucediendo es que MOD no estaría siendo capaz de prevenir la liberación de DA inducida por MET.

Por otro lado, la administración repetida de MET induce cambios estructurales de larga duración en el StLd y en el NAcc que incluyen el aumento de espinas dendríticas en forma de hongo, presuntamente maduras (Jedynak y cols., 2007). Este tipo de exposición repetida a MET deriva en el aumento de la expresión de FosB (Beauvais y cols., 2010) que cuando es a expensas de la expresión de  $\Delta$ FosB se corresponde con una sensibilización a los efectos de la droga (Nestler y cols., 2001). En nuestro caso no podemos saber si el aumento de FosB en el StLd es a expensas de la expresión de  $\Delta$ FosB debido a que se utilizó un anticuerpo que reconoce todas las variantes de FosB (no solo  $\Delta$ FosB) por lo cual este marcador no es útil para predecir la inducción de cambios plásticos que llevarán a la sensibilización de la respuesta a MET. Sin embargo, FosB induciría la expresión de factores tróficos, posiblemente en un intento de contrarrestar el efecto perjudicial de MET, ya que la administración de MET a ratones con el gen de FosB delecionado muestra una neurotoxicidad exacerbada respecto de los ratones wild type (Kuroda y cols., 2010). En este sentido, en nuestros resultados puede observarse un aumento en la expresión de FosB en el StLd de aquellos animales que recibieron MET que no pudo ser prevenido con la administración de MOD. Resulta importante destacar que el tratamiento de MOD por si mismo no indujo la expresión de este gen lo que se condice con la ausencia de alteraciones en los marcadores de toxicidad observado en el capítulo II. Finalmente, ninguno de los tratamientos provocó la activación de FosB en el NAcc y el hecho de que MET no indujera la activación de FosB en el NAcc condice con la menor susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas que provienen de la VTA e inervan el NAcc a los efectos tóxicos de MET (Khun y cols., 2011; Granado y cols., 2010).

El aumento de inmunorreactividad para GFAP es comúnmente utilizado como marcador de reactividad astrocitaria y su activación está presente en varias patologías del SNC. Se sabe que el tratamiento con MET incrementa la expresión de GFAP y que la misma permanece elevada hasta aproximadamente un mes del momento del tratamiento (O'Callaghan y Miller 1994). Si bien no se conoce con claridad la función de la activación astrogliar luego de la exposición a MET, su activación ha sido relacionada con cambios en la permeabilidad de la BHE (Kiyatkin y cols., 2009; Sharma y Kiyatkin, 2009) y/o con la exitotoxicidad del glutamato (Halpin y Yamamoto, 2012). En este sentido, nuestros resultados muestran una activación gradual de la astrogliá, luego del tratamiento con MET, con niveles máximos de activación a partir de las 48 horas posteriores al tratamiento. A su vez, pudimos observar una leve activación de la astrogliá por parte de MOD a las 16 y 48 horas posteriores al tratamiento que no está presente en el grupo M+M tratado con ambos estimulantes. Si bien la activación de los

astrocitos ante la exposición a estímulos nocivos tiene como principal objetivo limitar el daño tisular, la activación de la astrogliá por parte de MOD a valores mayores al salino en este caso no se refleja ni en una depleción del contenido de DA, ni en la expresión de FosB, ni en una alteración en los niveles de TH o DAT (capítulo II), lo que podría estar indicando que la función de estas células en este caso sería otra.

Finalmente, si bien no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual MET resulta tóxica para las terminales dopaminérgicas, se ha propuesto la activación de la microglía como factor agravante del daño (Thomas y Kuhn 2005). La activación microglial es dependiente de la dosis de MET y coincide temporalmente con la depleción de DA en el estriado (Thomas y cols., 2004), implica la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, la producción de ROS/RNS y el subsecuente daño neuronal (Czeh y cols., 2011). Más aún, factores que previenen la activación de la microglía por parte de MET, como administrar el tratamiento a bajas temperaturas, previenen el daño a los terminales dopaminérgicos (Thomas y cols., 2004).

Se ha propuesto el uso de compuestos que modulan la activación glial como parte del tratamiento clínico del abuso a psicoestimulantes (Cooper y cols., 2012). La administración de agentes que inhiben la activación de la microglía, como la minociclina, mostraron ser útiles en el bloqueo de la hiperlocomoción, el desarrollo de la sensibilización, el desarrollo de déficits cognitivos y la aparición de los efectos reforzantes en el condicionamiento de plaza inducidos por MET (Hashimoto y cols., 2007, Mizoguchi y cols., 2008 y Zhang y cols., 2006). La minociclina también logró atenuar la psicosis en un paciente con alucinaciones asociadas al consumo crónico de MET (Tanibuchi y cols., 2010). Por otro lado, la inhibición de la activación de la microglía con antagonistas de los receptores sigma (Robson y cols., 2013) también resultó efectiva en prevenir el desarrollo de alteraciones conductuales, la neurotoxicidad y la hipertermia asociadas al consumo de MET (Kaushal y cols., 2012, Seminerio y cols., 2011). MOD fue capaz de prevenir la activación tanto de la microglía como de la astrogliá por parte de MET como puede observarse en la sección resultados de este capítulo. No obstante, el bloqueo de la hiperlocomoción observado por MET en nuestro caso es a expensas de un aumento de la frecuencia de expresión de estereotipias, como fue discutido en los capítulos anteriores.

Además de la degeneración de terminales, MET es capaz de inducir apoptosis neuronal en el estriado y en la corteza de roedores (Jayanthi y cols., 1998, Beauvais y cols., 2010) mediante

la liberación de caspasas y la consecuente expresión de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 como BAD y BAX (Krasnova y Cadet 2009). Es por ello que, en esta segunda instancia, nos propusimos estudiar si MOD era capaz de prevenir la apoptosis inducida por la administración de un tratamiento tóxico con MET en el estriado.

Mediante la técnica A-Cu-Ag pudimos observar que la degeneración terminal inducida por MET comienza entre las 16 y las 48 horas posteriores a la administración del tratamiento. Esta disminución no coincide con el tiempo de disminución de los marcadores de terminales dopaminérgicos estudiados mediante las técnicas histoquímicas (TH y DAT), donde la disminución era significativa recién a los 6 días posteriores al tratamiento. Es por esta razón que, siendo la técnica A-Cu-Ag más sensible y útil para distinguir degeneración axonal aún cuando el soma de la neurona no es dañado, elegimos el tiempo de 16 horas después de la administración de MET para el estudio de los cambios de expresión de las proteínas relacionadas con la apoptosis. Nuestros resultados coinciden con lo observado luego de la administración de una única inyección de MET por el grupo de Jayanthi y cols., (1998) en que MET indujo la expresión de BAX y la disminución de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Por otro lado, observamos que MOD per se no sólo no alteró la expresión de estas proteínas sino que además fue capaz de prevenir la alteración en el patrón de expresión de las mismas por parte de MET.

En síntesis, nuestros resultados indican que los efectos protectores de MOD ya son evidentes a las 16 horas de recibido el tratamiento. Más aún, debido a que la activación de las células de la glía ocurre a tiempos posteriores, MOD podría estar interviniendo tempranamente en la cascada de activación de las mismas, evitando de este modo la exacerbación el inicio y el posterior avance del daño causado por el tratamiento con MET.

---

# CAPÍTULO IV

---

## A. INTRODUCCIÓN

### **Objetivo específico IV: Rol de la regulación de la temperatura corporal en el mecanismo neuroprotector de modafinilo frente a la toxicidad de metanfetamina en ratones hembra.**

La regulación de la temperatura corporal es un proceso complejo que resulta del balance entre la producción de calor y su disipación (Kiyatkin, 2010). La temperatura corporal varía de forma circadiana, siendo más baja en periodos de descanso o sueño y mayor en momentos de mayor actividad física durante la vigilia (Gordon y cols., 1998). En ratones, por ejemplo, durante el día (que coincide con periodos de inactividad) la temperatura corporal varía entre los 35 y los 37°C dependiendo de las condiciones de alojamiento de los animales y durante la noche (periodo de actividad) la temperatura corporal se incrementa en ~1 a 2°C (Gordon y cols., 1993; Leon y cols., 2010).

La mayoría de los estimulantes psicomotores de tipo anfetamínicos inducen activación motora, incrementan el metabolismo a nivel central (Estler y cols., 1975, Makisumi y cols., 1998) y elevan la temperatura corporal (Alberts y Sonsalla, 1995). La hipertermia es considerada una de las consecuencias fisiológicas agudas más peligrosas de la intoxicación con anfetaminas, siendo responsable de complicaciones fatales como la rabdomiólisis que puede desencadenar la falla renal aguda y derivar en una falla multiorgánica (Kalant, 2001). La hipertermia inducida por MET no debe ser confundida con la "hipertermia maligna", condición asociada en algunos casos a la mutación del gen que codifica el receptor rianodínico que también cursa con rabdomiólisis. La hipertermia a su vez tendría un rol esencial en el desarrollo de la neurotoxicidad inducida por estos estimulantes (Bowyer y cols., 1994, Miller y O'Callaghan, 1994).

A su vez, el encéfalo posee una temperatura significativamente más elevada que la sangre que lo irriga, cediendo el calor generado a nivel central a la sangre arterial (Kiyatkin, 2010). El aumento de temperatura a nivel central puede repercutir en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica con la consecuente alteración del balance iónico y osmótico el pasaje desde la circulación periférica de sustancias potencialmente neurotóxicas (Kiyatkin, 2010). Es por esta razón que resulta de suma importancia considerar las condiciones ambientales en las que se consumen los estimulantes ya que las mismas pueden contribuir a la disipación del calor a

nivel periférico (bajas temperaturas ambientales) o dificultarlo como sucede en ambientes calurosos.

El mecanismo mediante el cual MET y otros estimulantes anfetamínicos inducen hipertermia se encuentra relacionado con los efectos simpaticomiméticos de estas drogas, ya que se necesita más energía para llevar a cabo funciones tales como el aumento de la frecuencia cardíaca y la actividad locomotora. A su vez, los estimulantes inducen un aumento del metabolismo a nivel central y periférico que aumenta la producción de calor (Kiyatkin, 2010). En el caso de MET, esta mayor generación de calor se acompaña de una menor capacidad de disipación del mismo a causa de la vasoconstricción generada y su consecuente disminución del flujo sanguíneo cerebral (Poleskaya y cols., 2011) lo que desencadena la hipertermia cerebral.

Entre los mecanismos de generación de hipertermia por parte de MET está el aumento de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 $\beta$  en el hipotálamo (Bowyer y cols., 1994, Yamaguchi y cols., 1991) y el estriado junto con la expresión de TNF- $\alpha$  (Flora y cols., 2002; Sriram y cols., 2006), e interleuquinas de la familia IL-6 (Kelly y cols., 2012; Kuhn y cols., 2006) y la enzima COX-2 (Kita y cols., 2000; Thomas y cols., 2005). Esta enzima involucrada en la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2), compuesto que actúa como pirogéno endógeno en el área preóptica del hipotálamo o "centro de la fiebre". El área preóptica esta involucrada en la regulación de temperatura en vertebrados (Boulant, 2000) y en las respuestas de defensa frente a virus y bacterias (Scammell y cols., 1996). No obstante, no esta claro si la inflamación también es partícipe de la respuesta hipertérmica observada (Bowyer y cols., 1994, Thomas y Kuhn, 2005).

En conclusión, la hipertermia es un factor importante ya que dosis hipertérmicas de MET inducen un mayor daño dopaminérgico (Bowyer y cols., 1994). Con el aumento de temperatura, la función del DAT también se encuentra aumentada (Xie y cols., 2000) y esto podría significar que la cascada de eventos tóxicos mediados por MET que involucran la acción del DAT también podría hallarse amplificada (Callahan y cols., 2001). Más aun, la neurotoxicidad inducida por MET puede ser modulada con drogas o tratamientos que previenen la hipertermia (Bowyer y cols., 1994, Miller y cols., 1994). En este punto también algunos autores encontraron resultados contradictorios y afirman que no se pueden predecir

los cambios neuroquímicos a partir de los cambios de temperatura corporal observados (Albers y Sonsalla, 1995; Thomas y Kuhn, 2005).

Resulta interesante destacar que la mayoría de los estudios que involucran el uso de animales de laboratorios se realizan en condiciones ideales de alojamiento (Gordon y cols., 1993). Estas condiciones implican trabajar en una humedad relativa entre el 30 y 70% y en condiciones de temperatura ambiente en las que el animal termorregule sin necesidad de incrementar su metabolismo energético o activar mecanismos de disipación de calor (rango aceptado para ratones 18-26°C, National Research Council, 2010). Estas condiciones, sin embargo no reflejan las situaciones más comunes de consumo de estimulantes, como discotecas", que son lugares generalmente húmedos y calurosos que impactan sobre la capacidad de termorregulación del organismo (Kiyatkin y Sharma, 2012).

Por lo anteriormente expuesto, en este capítulo nos propusimos establecer si la neurotoxicidad inducida por MET se encuentra asociada a los cambios de temperatura corporal, como fuera postulado por algunos autores y si la prevención de la hipertermia forma parte del mecanismo neuroprotector de MOD. Para cumplir con este propósito los animales fueron tratados a una temperatura ambiente estándar (22°C) y a dos temperaturas extremas (14 y 29°C) como aproximación experimental para manipular el cambio de la temperatura corporal de los animales. A su vez, los experimentos realizados en este capítulo nos permitirán evaluar el impacto del cambio de la temperatura ambiente sobre la neurotoxicidad inducida por MET y el efecto de MOD.



## B. METODOLOGÍA

### I. Animales

Ver metodología del **capítulo II**.

### II. Protocolo de administración de drogas.

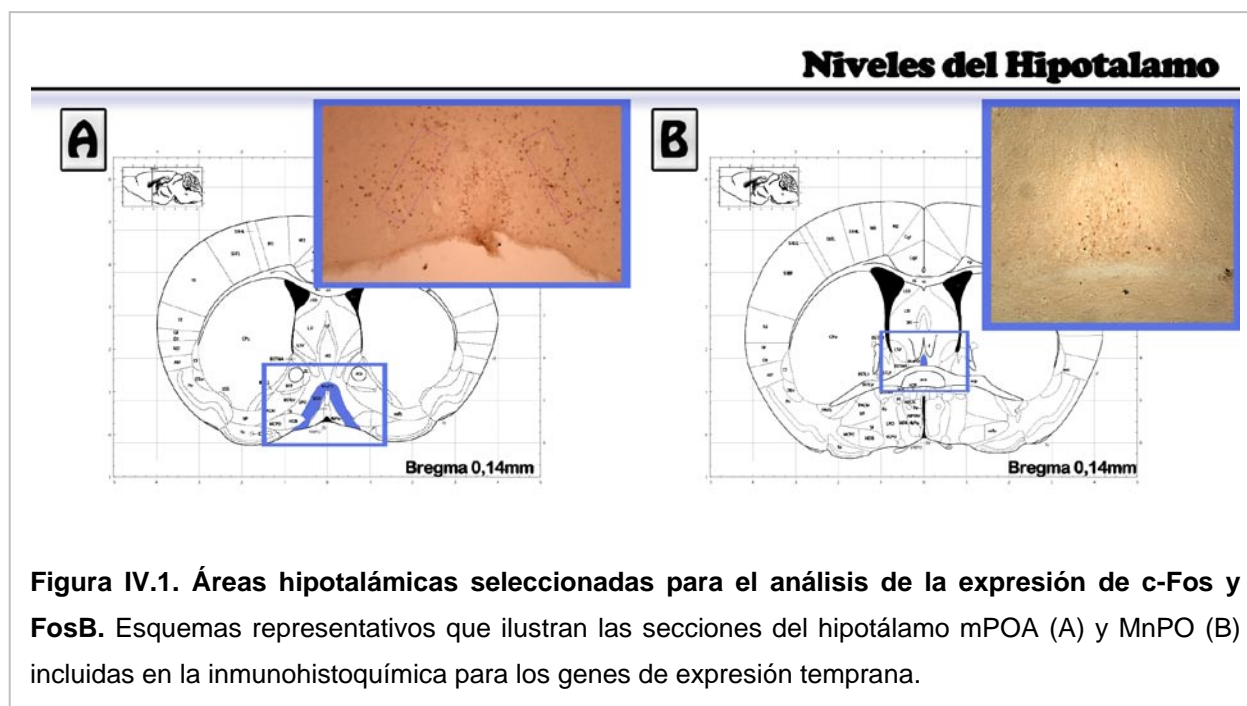
Se siguió con el mismo protocolo de administración toxica de MET explicado en la sección metodología del capítulo II. Los animales fueron ingresados a la sala aclimatada a la temperatura a estudiar (14, 22 ó 29°C) desde 90 minutos antes de la administración de MOD y hasta pasadas las 3 horas luego del tratamiento. Luego, los animales retornaron al bioterio del Instituto.

### III. Registro de la temperatura rectal

Se procedió a la medición de la temperatura rectal con un termómetro marca Bat-IO acoplado a una sonda rectal RET-3 para ratón (Physitemp, Inc., NJ, USA) lubricada con aceite mineral. La primera lectura (temperatura basal) se realizó 1 hora antes de la primera inyección de MOD. Las lecturas subsiguientes se tomaron 1 hora después de cada inyección de MET y durante las 3 horas posteriores al tratamiento. El último registro se realizó a las 16 horas de la última inyección de MET, a la temperatura del bioterio (18-22°C).

### IV. Técnicas histoquímicas

Para cada temperatura analizada se realizaron las tinciones inmunohistoquímicas para TH, DAT, GFAP (6 días posteriores al tratamiento), c-Fos y FosB (1 hora luego de la última inyección de MET) en el StLd según la sección metodología de los capítulos II y III respectivamente. Dado que el área preóptica media (mPOA) junto con el núcleo preóptico mediano (MnPO) son dos áreas del hipotálamo involucradas en los mecanismos de termorregulación, también se realizó la inmunomarcación de c-Fos y FosB en ellas según se muestra en la **Figura IV.1**.



## V. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico InfoStat versión 2013 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>) y en todos los casos se consideraron significativas las diferencias con un valor de  $p < 0,05$ .

El análisis de datos del cambio de temperatura en función del tiempo se realizó mediante el ANOVA de medidas repetidas. Los datos neuroquímicos se analizaron mediante el ANOVA de dos factores (temperatura y tratamiento) seguido de la prueba de la mínima diferencia significativa de Fischer (LSD) siempre que la variable siguiera una distribución normal y cumpliera con el supuesto de homocedasticidad. En caso de no cumplirse los supuestos se procedió a la transformación de los datos y en caso de haber interacción entre los factores se procedió al análisis mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para encontrar las diferencias.

Finalmente, para el estudio de la relación entre las distintas variables y la temperatura de los animales se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

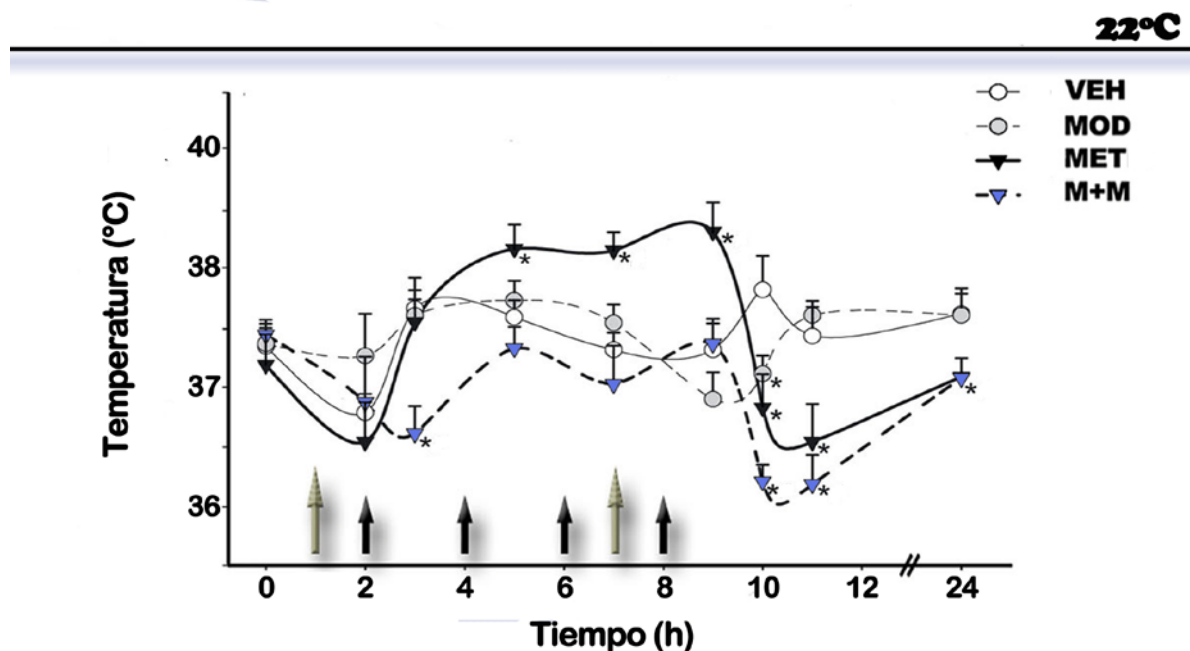
### C. RESULTADOS

Para evaluar de qué modo las variaciones de la temperatura externa repercuten sobre la temperatura corporal de los animales sometidos a los distintos tratamientos nos planteamos:

#### I. Analizar los cambios de la temperatura corporal cuando los tratamientos son llevados a cabo a diferentes temperaturas externas:

En una primera instancia se registraron los cambios de la temperatura corporal de los animales a lo largo del tratamiento cuando el mismo es administrado a 22°C, temperatura dentro del rango estándar para los ratones. Como se muestra en la **Figura IV.2**:

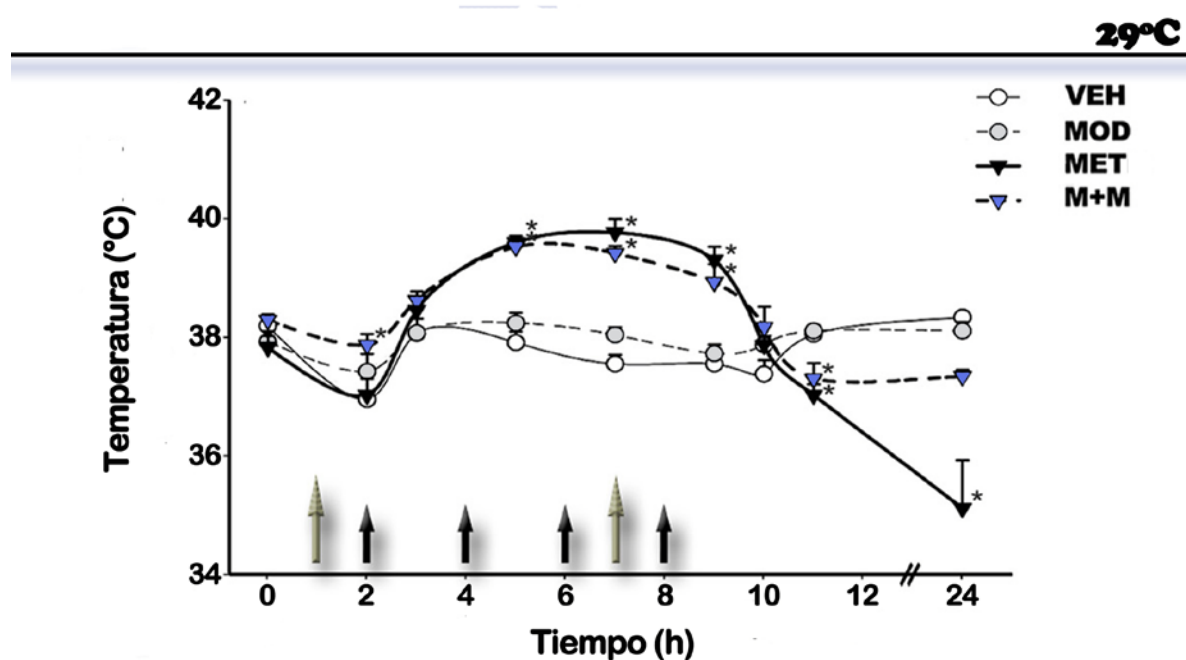
- MOD previno la hipertermia inducida por MET, manteniéndose el mismo perfil de cambio de temperatura corporal (forma de la curva) en el grupo M+M respecto del grupo MET.
- En el grupo M+M, se observó una disminución de la temperatura corporal en aquellos tiempos en los que MET no indujo hipertermia (5, 7 y 9 horas)
- En el grupo VEH, 24 horas después de iniciado el tratamiento la temperatura de los animales no cambia respecto a la del día del tratamiento a la misma hora, posiblemente debido a que el cambio de la temperatura sigue un ritmo circadiano de 24 horas ( $p < 0,05$ ).



**Figura IV.2. Análisis de la variación de la temperatura corporal al administrar MOD junto con un binge de MET.** Se registró la temperatura corporal 1h antes de MOD y a diferentes intervalos de tiempo subsiguientes. Las flechas negras indican las inyecciones de MET (5 mg/kg) mientras que las flechas grises indican las de MOD (90 mg/kg) Los datos se presentan como temperatura corporal media (°C) ± SEM (n=7-8). ANOVA de medidas repetidas seguido del test LSD de Fisher, \*  $p < 0,05$  vs. VEH.

Dado que no existe una definición precisa sobre cuál es el límite superior de la temperatura normal en ratones, consideraremos “hipertermia” siempre que la temperatura del animal sea mayor a la de VEH. Luego, estableceremos como “rango febril” cuando las temperaturas superen los 39,5°C, como lo reporta la bibliografía (Jiang y cols., 1999). Finalmente, definiremos como “hipotermia leve o terapéutica” cuando la temperatura de los animales esté comprendida entre los 32 y los 34°C (Feketa y cols., 2013).

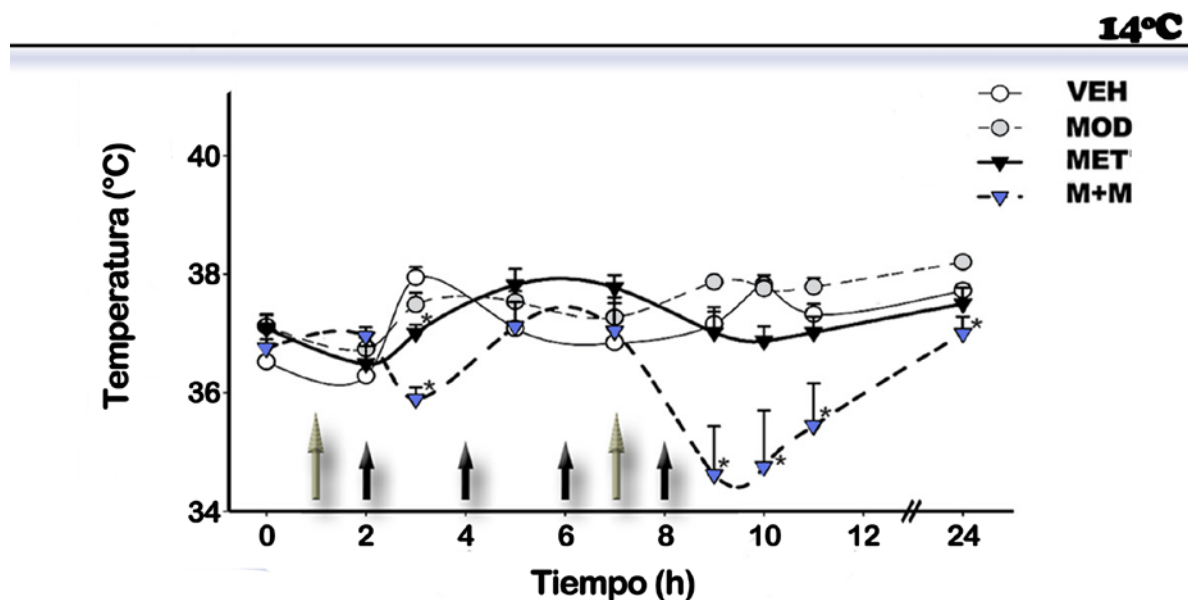
Luego, para evaluar si el efecto neuroprotector de MOD se encuentra relacionado con la prevención de la hipertermia causada por MET, se realizó nuevamente el tratamiento en una sala termostatzada a 29°C (29°C±1) como se muestra en la **figura IV.3**. Así, los animales alcanzarán temperaturas corporales más altas debido a la menor capacidad de disipación de calor, siendo posible evaluar si MOD es neuroprotector aún cuando la temperatura de los animales es elevada.



**Figura IV.3. Análisis de la variación de la temperatura corporal al administrar MOD junto con un binge de MET a 29°C.** Se registró la temperatura corporal 1h antes de MOD y a diferentes intervalos de tiempo subsiguientes. Las flechas negras indican las inyecciones de MET (5 mg/kg) mientras que las flechas grises indican las de MOD (90 mg/kg). Los datos se presentan como temperatura corporal media (°C) ± SEM (n=6-10). ANOVA de medidas repetidas seguido del test LSD de Fisher, \*p<0.05 vs. VEH.

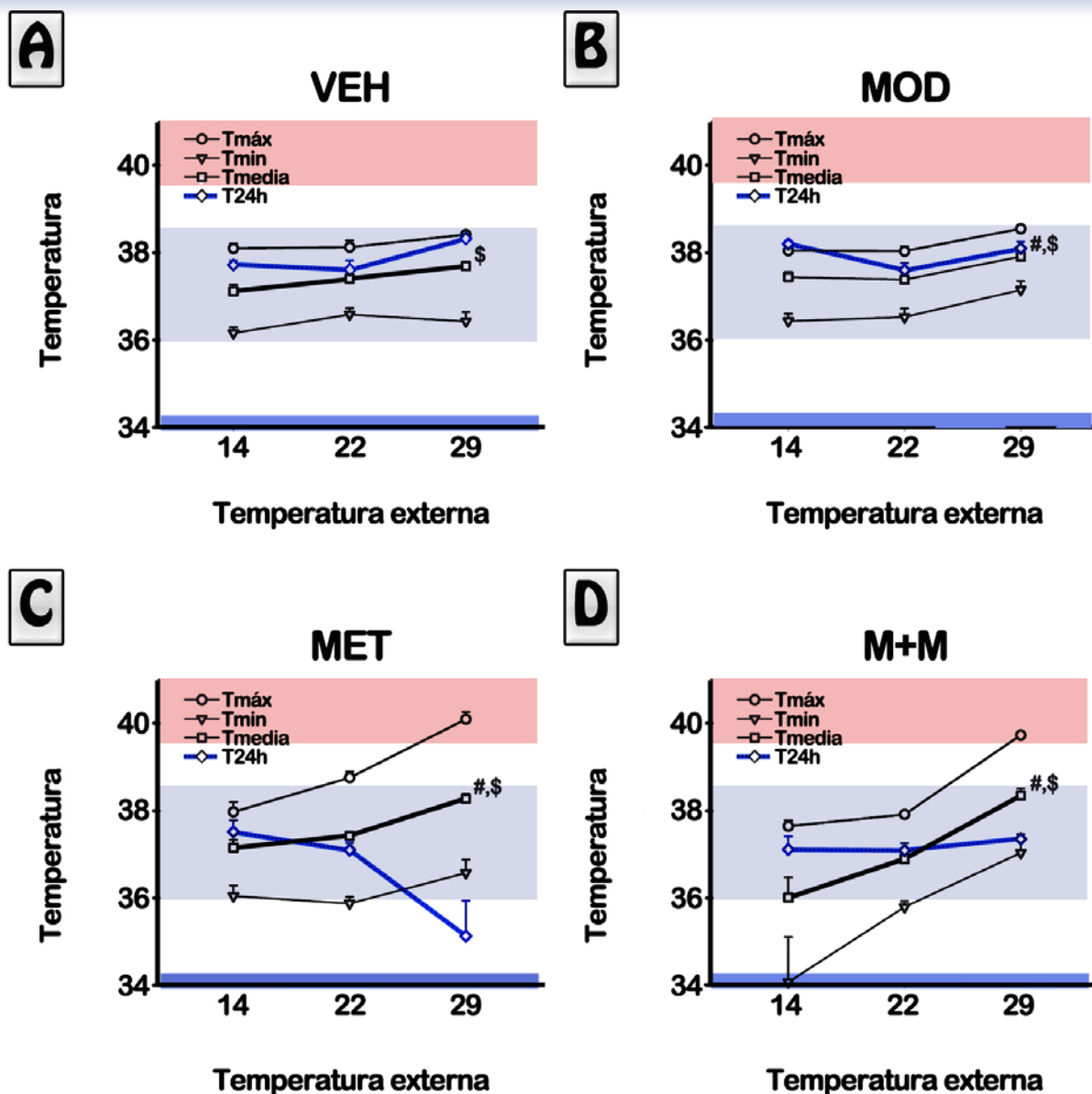
En la **figura IV.3** se puede observar que MOD no fue capaz de prevenirla hipertermia inducida por MET a 29°C.

Por último, con el objeto de relacionar la hipertermia con la toxicidad inducida por MET, se repitió el experimento a 14°C (14°C±1), condición en la que MET no debería inducir hipertermia o la misma debería verse disminuida. En la **Figura IV.4** se puede observar que el grupo tratado con MET no produjo hipertermia.



**Figura IV.4.** Análisis de la variación de la temperatura corporal al administrar MOD junto con un *binge* de MET a 14°C. Se registró la temperatura corporal 1h antes de MOD y a diferentes intervalos de tiempo subsiguientes. Las flechas negras indican las inyecciones de MET (5 mg/kg) mientras que las flechas grises indican las de MOD (90 mg/kg). Los datos se presentan como temperatura corporal media (°C) ± SEM (n=5-8). ANOVA de medidas repetidas seguido del test LSD de Fisher, \*p<0.05 vs. VEH.

### Termorregulación



**Figure IV.5. Efecto del cambio de temperatura externa sobre la temperatura corporal para distintos tratamientos.** Los resultados se muestran como el promedio de la temperaturas de los animales a lo largo del tratamiento (Tmedia, cuadrado), el promedio de la temperatura máxima alcanzada en todo el tratamiento entre los animales del grupo (Tmáx, círculo) y el promedio de la temperatura mínima alcanzada en todo el tratamiento entre los animales del grupo (Tmín, triángulo invertido). Finalmente, el promedio de la temperatura registrada a las 24hs de iniciado el tratamiento se muestra en línea azul (diamantes). En el gráfico cada punto representa la media  $\pm$  SEM. La franja roja superior representa el rango febril, la franja azul inferior representa el rango de hipotermia terapéutica y la franja media representa los rangos de temperatura abarcados por el grupo VEH durante el tratamiento. ANOVA de una vía. Prueba LSD de Fisher, #  $p < 0.05$  vs 22°C, \$  $p < 0.05$  vs 14°C.

En la **Figura IV.5** puede observarse que:

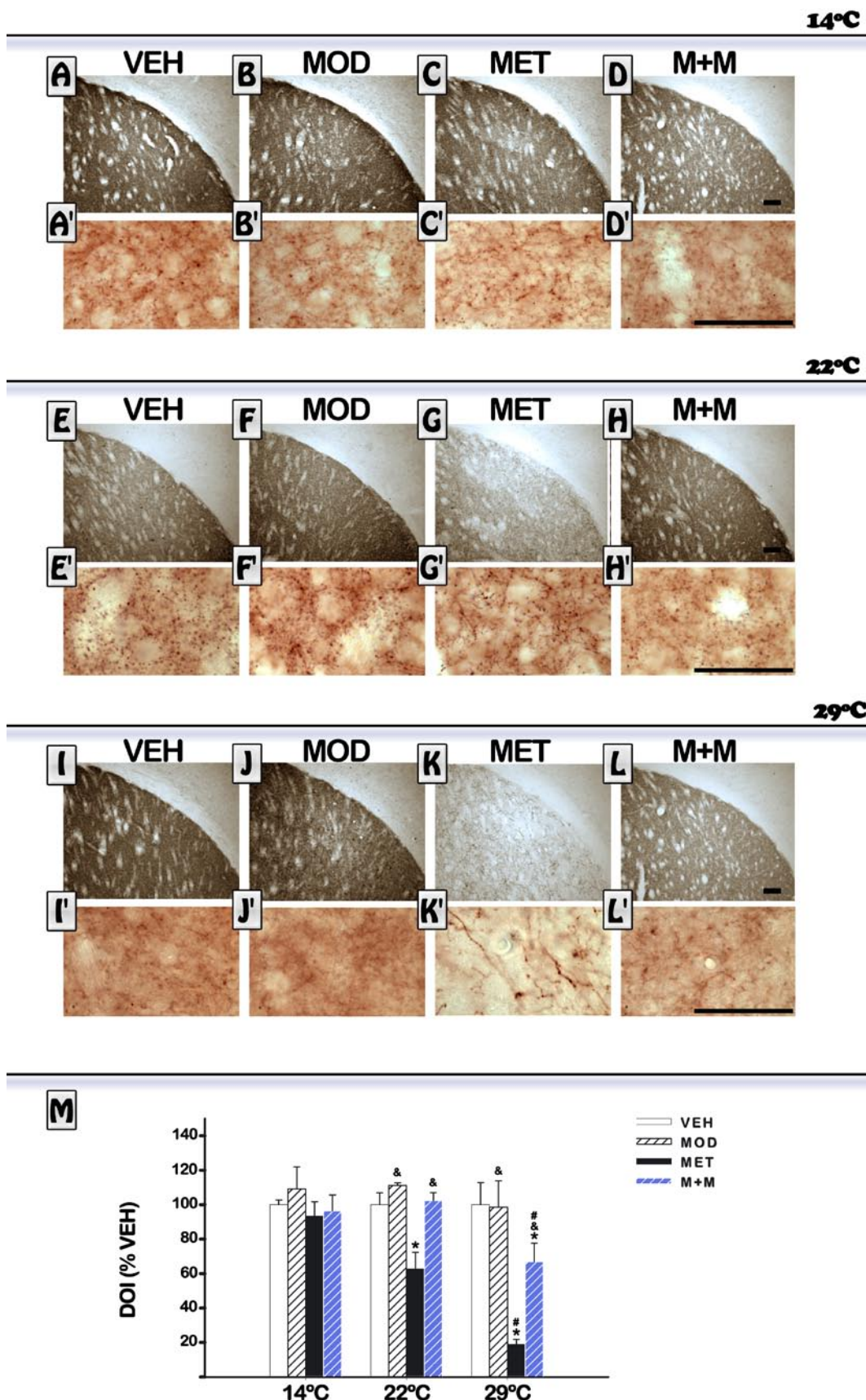
- En todos los grupos, incluido el grupo VEH, los valores de temperatura media fueron más altos para el tratamiento realizado a 29°C.
- En el grupo MOD se registraron valores de temperatura máxima, media y mínima dentro de los rangos de variación de temperaturas del grupo VEH (franja azul).
- El grupo MET alcanzó valores de temperatura máxima a 22 y 29°C superiores a los del grupo VEH. De hecho, a 29°C MET mostró valores comprendidos en el rango febril.
- Pasadas las 24 horas de iniciado el tratamiento (16 horas después de la última inyección de MET) en el grupo MET se observaron valores de temperatura corporal inferiores a la temperatura basal ( $35,1^{\circ}\text{C}\pm 0,8$ ).
- Los animales pertenecientes al grupo M+M mostraron una pendiente pronunciada de cambio de temperatura corporal en función de la temperatura externa. De este modo la temperatura corporal fue más dependiente de la temperatura externa. Se observaron valores de temperatura máxima en el rango febril a 29°C y de hipotermia a 14°C.

## II. Estudiar el efecto neuroprotector de MOD frente a la toxicidad estriatal inducida por MET cuando el tratamiento es administrado a distintas temperaturas:

Debido al hecho de que la hipertermia generada por MET podría estar relacionada con el alcance del daño estriatal dopaminérgico (Bowyer y cols., 1994) es que nos propusimos evaluar las alteraciones de los marcadores de terminales junto con la activación astrogliál seis días después de haber tratado a los animales. Este tiempo fue elegido en base a lo observado en el capítulo II de esta tesis al ser el más sensible para ver cambios en los marcadores elegidos.

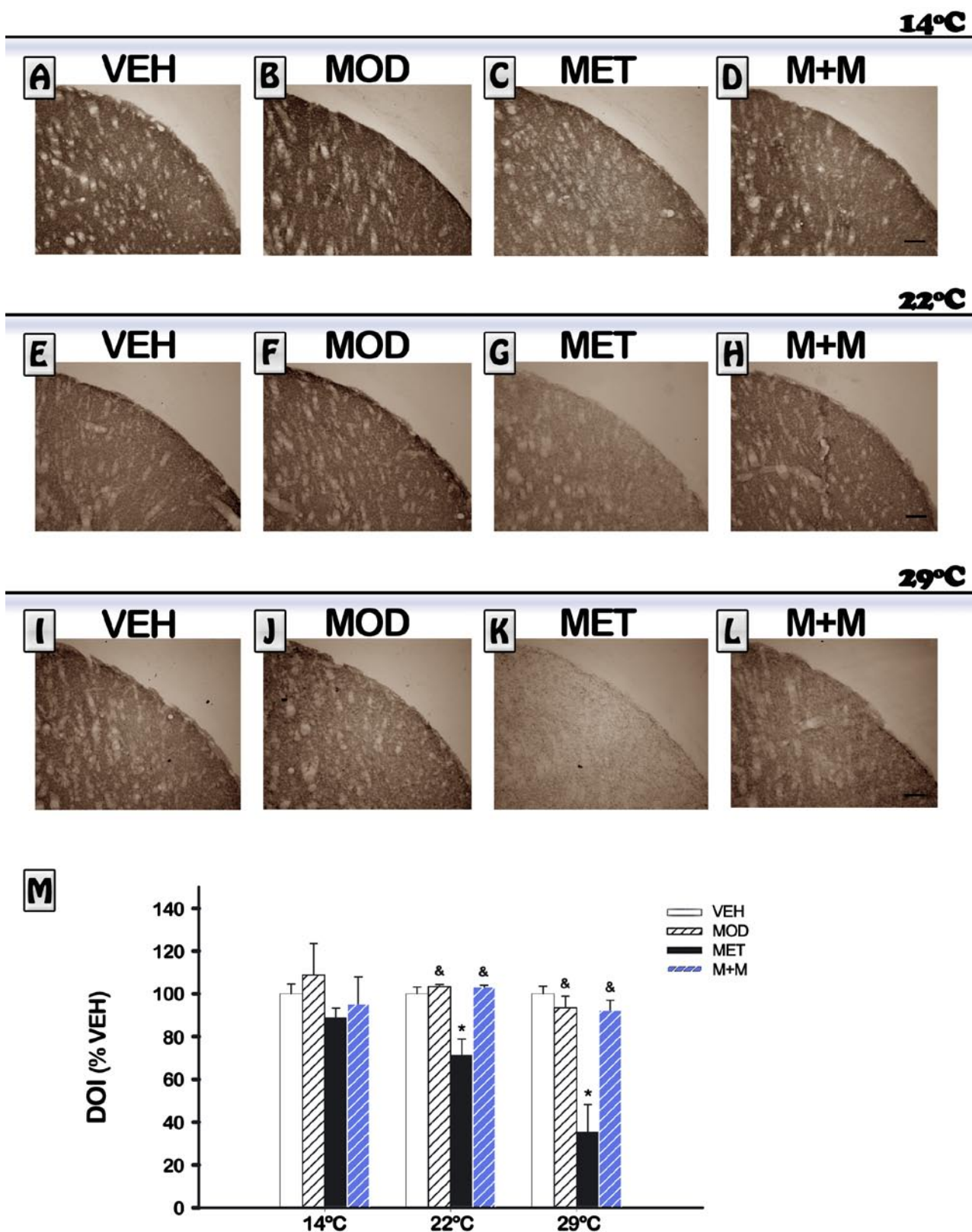
### *a. Marcadores dopaminérgicos en el Cuerpo Estriado*

En este punto se procedió a la cuantificación de la inmunomarcación para TH y para DAT, como se muestra en las **Figuras IV.6** y **IV.7**.



**Figure IV.6.** Efecto de la temperatura externa sobre la disminución de TH en el estriado. Análisis de inmunoreactividad para TH en los estriados 6 días luego del tratamiento con MET. Los datos se presentan como densidad óptica Integrada (DOI) ± SEM (n=5-11). ANOVA de dos vías. Prueba LSD de Fisher, \* p<0.05 vs. VEH, & p<0.05 vs. MET, # p<0.05 vs mismo tratamiento a 22°C. Escala (A-L) 100µm, escala (A'-L'): 50µm





**Figura IV.7. Efecto de la temperatura externa sobre el la disminución de DAT en el estriado.** Análisis de la disminución de los niveles de DAT en los estriados 6 días luego de la última inyección de MET. Los datos se presentan como densidad óptica Integrada (DOI) ± SEM (n=5-11). Kruskal-Wallis: \* p<0.05 vs. VEH, & p<0.05 vs. MET, # p<0.05 vs mismo tratamiento a 22°C. Escala (A-L) 100µm.

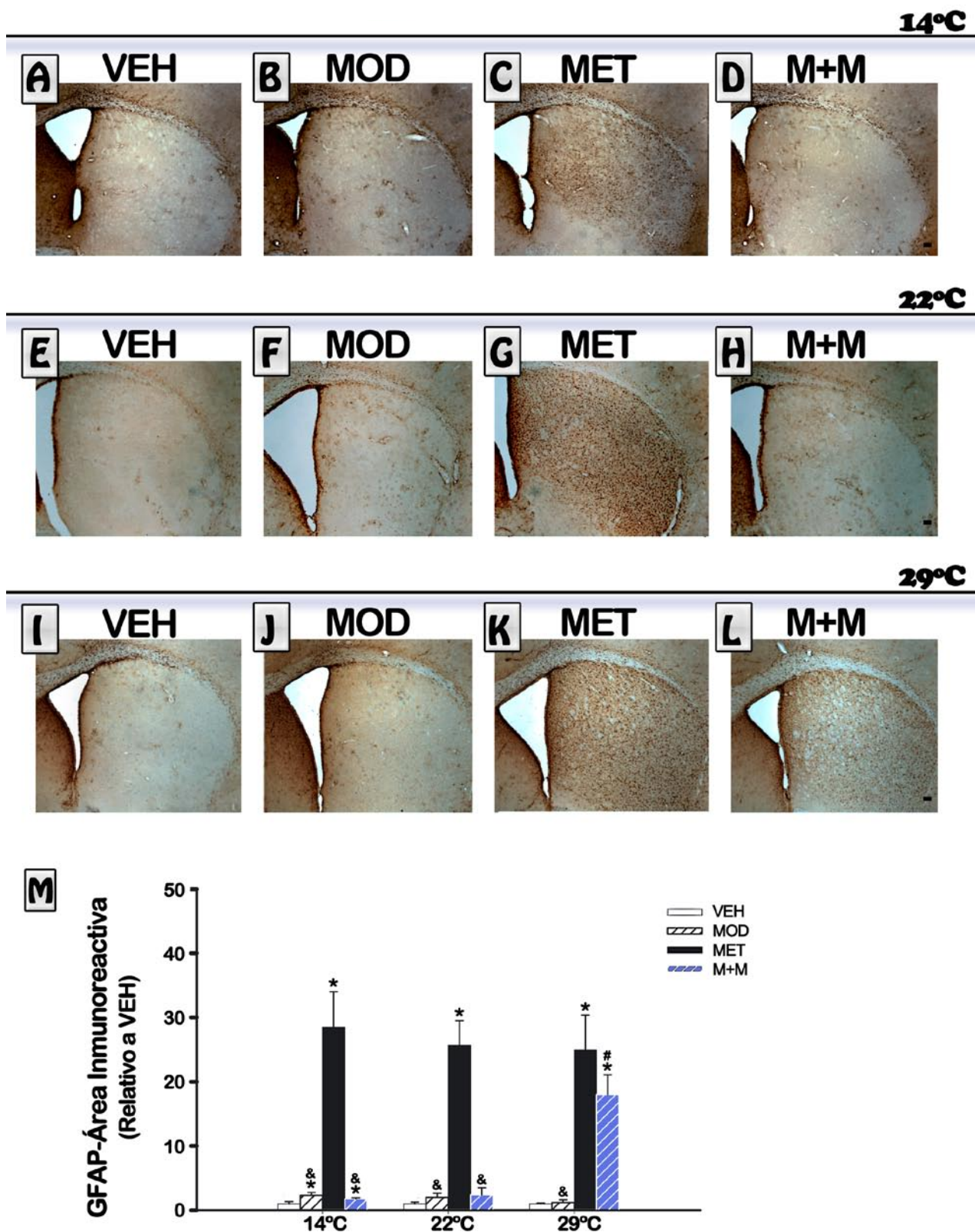
De las Figuras IV.6 y IV.7 se desprende que:

- A una temperatura externa de 14°C no se observaron alteraciones en la densidad de marcación para TH y DAT para ninguno de los grupos de tratamiento.
- El tratamiento con MOD no indujo alteraciones en los marcadores dopaminérgicos a ninguna de las temperaturas estudiadas.
- El tratamiento con MET indujo una disminución de la marca inmunorreactiva para ambos marcadores de terminales dopaminérgicos a 22 y 29°C, siendo esta disminución significativamente más pronunciada a 29°C para el caso de TH.
- La administración de MOD previno la disminución de TH y DAT a 22°C. A temperaturas más altas como 29°C, MOD también logró prevenir por completo la reducción de la marca reactiva de DAT (grupo M+M). No obstante, cuando los tratamientos fueron administrados en un ambiente de alta temperatura, la prevención de la disminución de marca para TH inducida por MET fue prevenida sólo de modo parcial por parte de MOD.

#### ***b. Respuesta de la astrogliá en el estriado***

Como ha sido mencionado en el capítulo II, la gliosis reactiva es un marcador que se utiliza para evaluar la neurotoxicidad (O'Callaghan y Miller, 1993). En la **Figura IV.8** se muestra la activación de la astrogliá en función del tratamiento y de la temperatura de la sala a la cual fueron tratados los animales y como se puede observar:

- El tratamiento con MET indujo una gliosis reactiva a todas las temperaturas alcanzando siempre el mismo nivel de activación.
- La combinación de M+M previno la activación a 14 y 22°C, no así a 29°C.
- A 14°C, los grupos MOD y M+M mostraron un mayor grado de activación de la astrogliá respecto del grupo control pero a niveles significativamente menores a los observados en el grupo MET.



**Figura IV.8. Efecto de la temperatura externa sobre la activación astrogliál en el estriado.** Análisis de la inmunorreactividad para GFAP en los estriados 6 días luego de la última inyección de MET. Los datos se presentan como % de área inmunorreactiva promedio  $\pm$  SEM (n=5-11). ANOVA de dos vías. Prueba LSD de Fisher, \*p<0.05 vs. VEH, & p<0.05 vs. MET, # p<0.05 vs mismo tratamiento a 22°C. Escala (A-L) 100  $\mu$ m.

### III. Analizar la correlación existente entre la temperatura máxima corporal y la alteración de los marcadores de toxicidad estudiados:

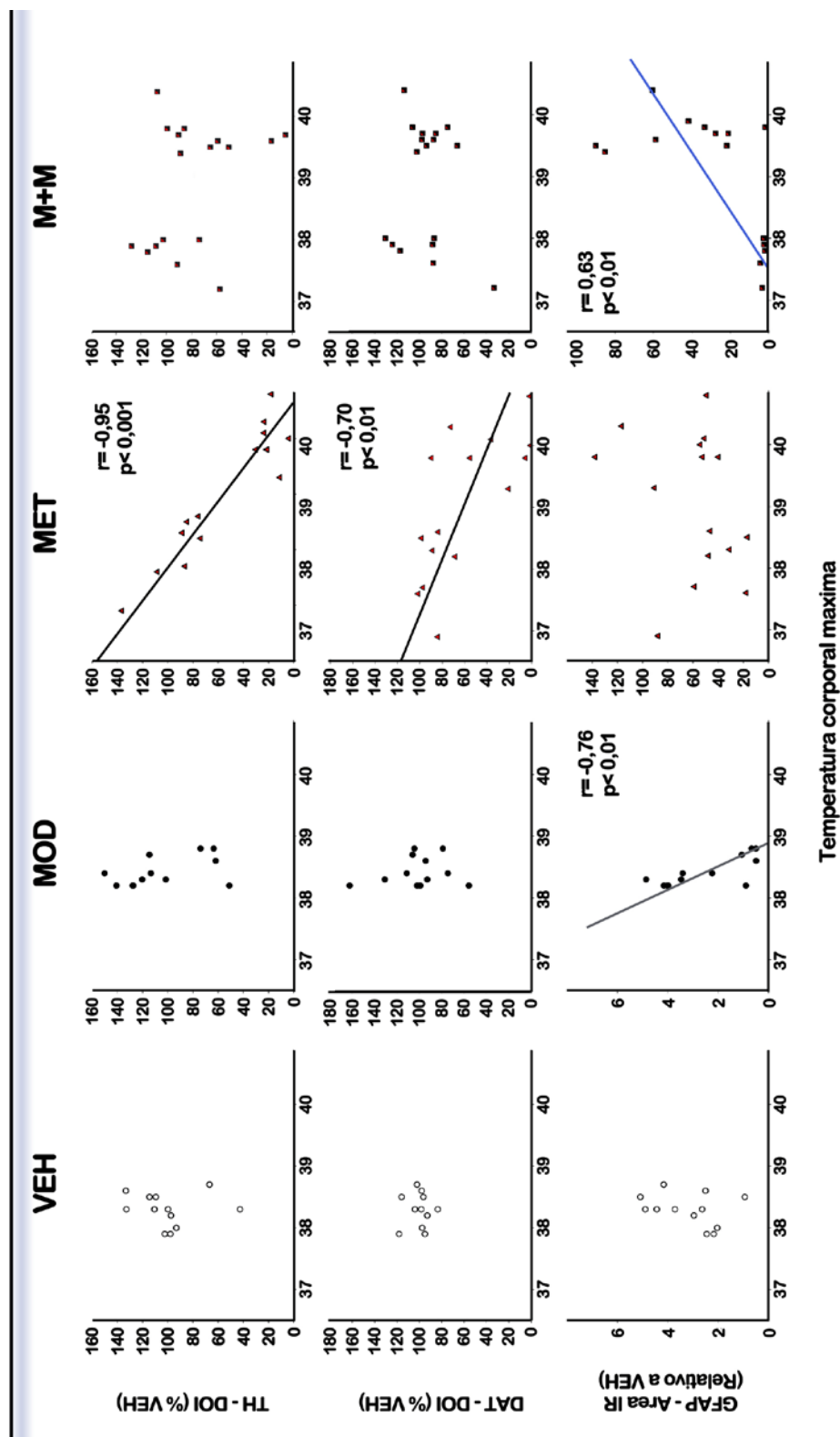
En esta sección, nos propusimos evaluar si las alteraciones observadas en los marcadores de toxicidad correlacionan con los cambios de la temperatura corporal experimentados por cada animal. Para esto se analizó la correlación existente entre las temperaturas mínima/media/máxima/ $\Delta$ (máxima-mínima) alcanzadas por cada animal con cada uno de los marcadores. Luego, en los casos en los que la diferencia fuera significativa, mediante el coeficiente "r" de Pearson se estableció el grado de relación entre ambas variables.

En la **Figura IV.9** se muestra el análisis de la correlación entre la temperatura máxima alcanzada por los animales durante el tratamiento y los marcadores de toxicidad. Se utilizó la temperatura máxima alcanzada ( $T_{\text{máx}}$ ) ya que la misma resultó ser la variable que mejor correlación mostró con los cambios observados en los marcadores.

Del análisis de las correlaciones se desprende:

- En el grupo MET la disminución de los marcadores se encontró altamente correlacionada con la temperatura corporal máxima alcanzada.
- En el grupo MOD la activación de la astrogliía estuvo inversamente relacionada con la temperatura máxima alcanzada.
- En el grupo M+M, la activación de las células de la astrogliía mostró correlacionar positivamente con la temperatura máxima alcanzada por los animales durante el tratamiento.
- En el grupo MET, la gliosis reactiva se produjo independientemente de la temperatura que alcance el animal por lo que no hay correlación entre la temperatura máxima y el grado de activación de la glía.
- En los grupos VEH y MOD no hubo correlación entre los niveles de los marcadores de toxicidad TH y DAT y la temperatura máxima alcanzada por los animales.

**Correlaciones**

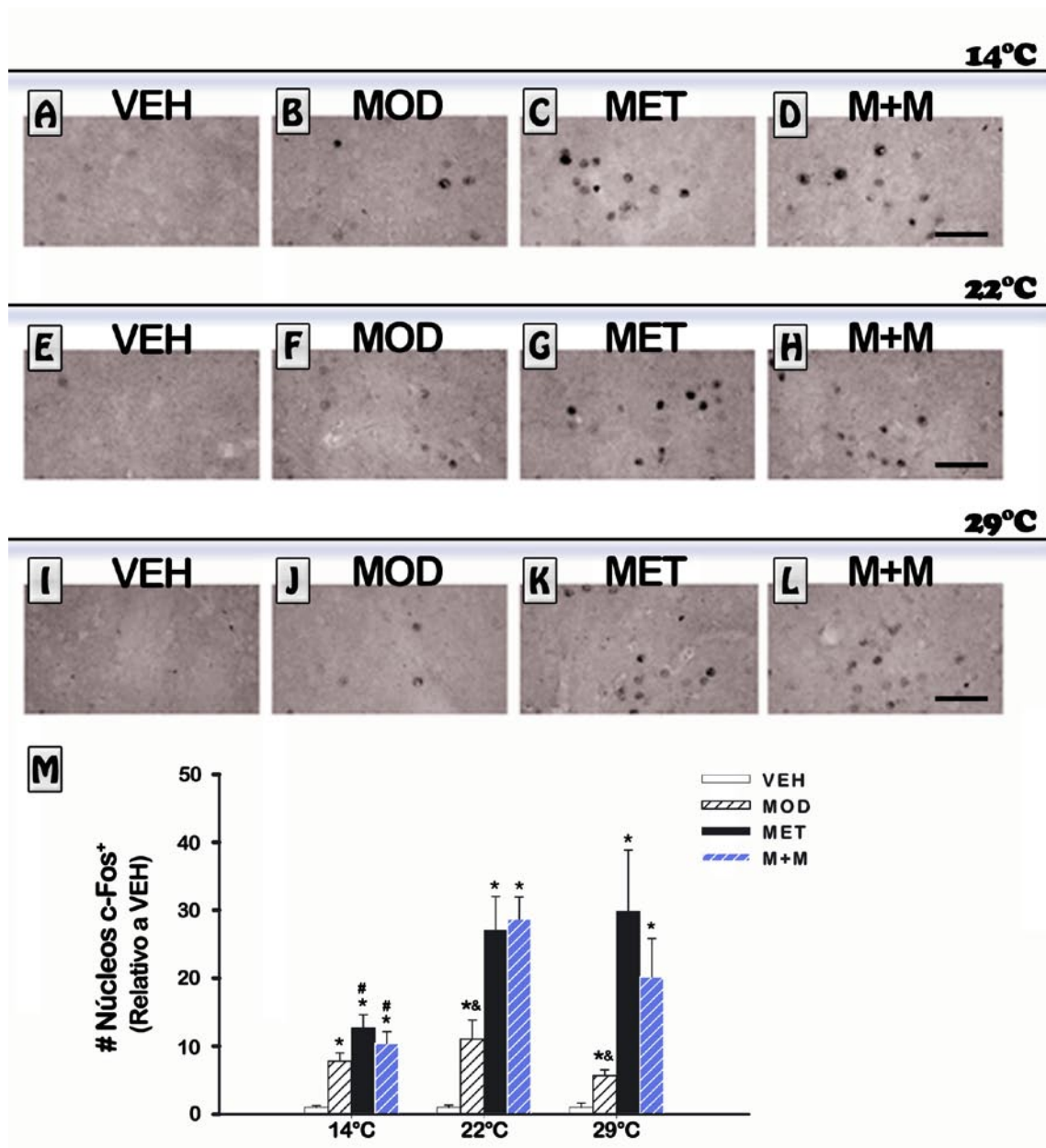


**Figura IV.9. Análisis de correlación entre la alteración de los marcadores de toxicidad y la temperatura máxima alcanzada por los animales durante el tratamiento.** La correlación entre la máxima temperatura experimentada por los animales durante el tratamiento y la disminución de la marca reactiva de TH (panel superior), DAT (panel medio) y el aumento del área inmunorreactiva para GFAP (panel inferior) fue realizada para los animales tratados a 14 y 29°C mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Los valores del coeficiente r de Pearson se muestran en el gráfico en aquellos casos en los que se cumple que p<0,05.

IV. Estudiar la repercusión del cambio de temperatura corporal sobre la expresión de genes de activación temprana en el estriado.

a. *Expresión de c-Fos en el estriado*

Se procedió a evaluar el número de neuronas c-Fos positivas en el StLd 1 hora después de la última inyección del *binge* de MET con el objeto de investigar si el incremento de la actividad neuronal depende de la temperatura. Como se puede observar en la **Figura IV.10**:



**Figure IV.10. Efecto de la temperatura externa sobre la expresión de c-Fos en el estriado.** Análisis de la expresión de c-Fos en el estriado 1h luego de la última inyección de MET. Los datos se presentan como número medio de núcleos positivos para c-Fos  $\pm$  SEM. ANOVA de dos vías, prueba LSD de Fisher, \*  $p < 0.05$  vs. VEH, &  $p < 0.05$  vs. MET, #  $p < 0.05$  vs mismo tratamiento a 22°C. Escala (A-L): 50 $\mu$ m.

Como se puede observar:

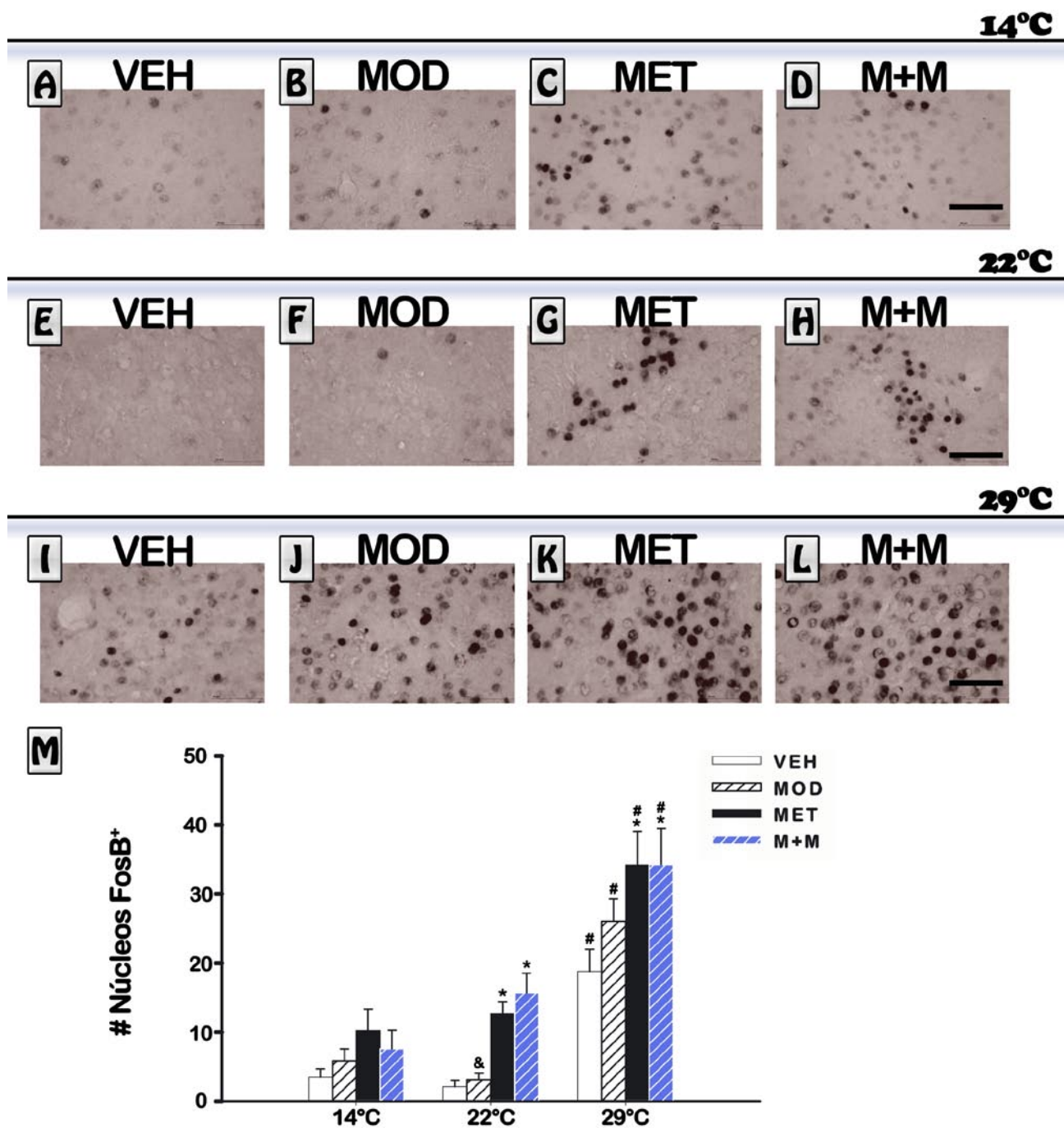
- Los grupos tratados con MOD, MET y M+M presentaron un mayor número de núcleos positivos para c-Fos que el grupo vehiculo a todas las temperaturas estudiadas.
- La marca para cFos en el StLd de animales tratados solo con MOD no vario frente a cambios de la temperatura externa.
- A 14°C los grupos que recibieron MET mostraron una menor activación de c-Fos respecto de cuando el tratamiento se realizó a 22 o a 29°C.
- So obtuvieron los mismos resultados al estudiar de activación de c-Fos en el StLd cuando los tratamientos fueron administrados a 22°C y a 29°C.

#### ***b. Expresión de FosB en el estriado***

Finalmente se procedió a la cuantificación de FosB en el estriado en animales tratados a distintas temperaturas externas.

Como puede observarse en la **Figura IV.11**:

- A 14°C no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos.
- A 22°C los grupos MET y M+M se encontraron más activados que los grupos que no recibieron MET.
- El tratamiento a 29°C activó el estriado de todos los grupos respecto del tratamiento realizado a 22°C, incluido el grupo VEH lo que estaría indicando que la activación de FosB en el estriado depende de la temperatura externa.
- A 29°C, y al igual que a 22°C, los grupos que recibieron MET mostraron una mayor activación que los grupos que no recibieron MET.
- MOD no mostró diferencias en el número de núcleos FosB inmunorreactivos respecto del grupo control a ninguna de las temperaturas estudiadas.



**Figura IV.11. Efecto de la temperatura externa sobre la expresión de FosB en el estriado.** Análisis de la expresión de FosB en el estriado 1h luego de la última inyección de MET. Los datos se presentan como número medio de núcleos positivos para FosB  $\pm$  SEM (n=5-11). ANOVA de dos vías, prueba LSD de Fisher, \*p<0.05 vs. VEH, &p<0.05 vs. MET, # p<0.05 vs mismo tratamiento a 22°C. Escala (A-L): 50 $\mu$ m.



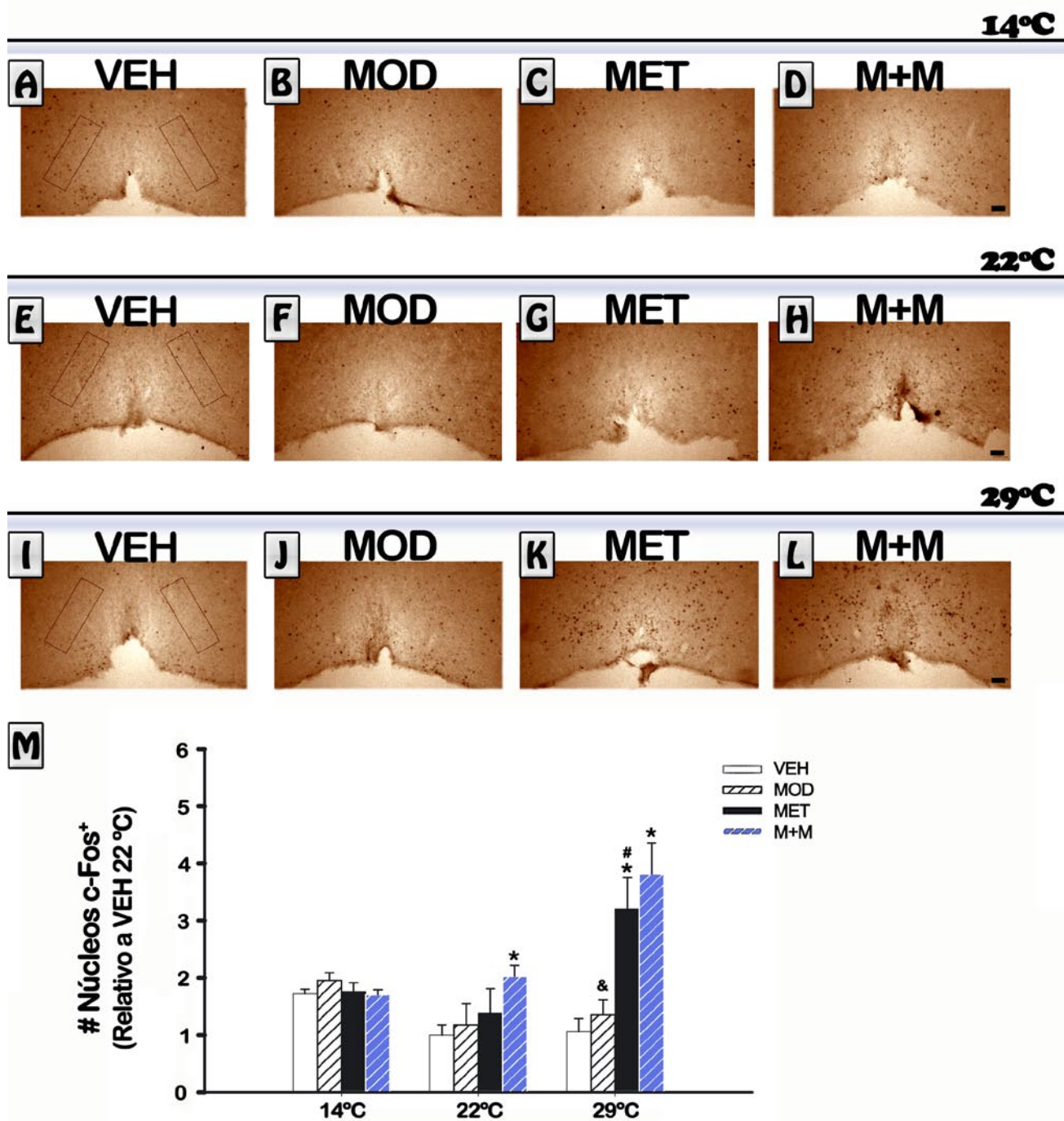
V. Evaluar el efecto de MOD frente a la activación de áreas hipotalámicas relacionadas con la regulación de la temperatura corporal inducida por MET cuando el tratamiento es administrado a distintas temperaturas:

*a. Expresión de c-Fos en el mPOA (Área Preóptica Media)*

El área preóptica del hipotálamo se encuentra involucrada en mecanismos de termorregulación y equilibrio osmótico. Contiene neuronas sensibles a cambios de temperatura locales y sistémicos y recibe aferencias somato-sensoriales provenientes de termorreceptores ubicados en la piel y a nivel de la columna espinal. De este modo es capaz de responder tanto a cambios internos como externos de temperatura (Boulant, 1998).

El mPOA contiene neuronas sensibles al calor y, en menor proporción, neuronas sensibles al frío. Las neuronas sensibles al calor incrementan su frecuencia de disparo en respuesta a incrementos locales o periféricos de temperatura y estimulan la pérdida de calor y la disminución de su producción. Las neuronas sensibles al frío incrementan su frecuencia de disparo luego de un enfriamiento local o periférico con el propósito de estimular la producción de calor e inhibir mecanismos encargados de disiparlo (Boulant, 2000).

Con el objeto de evaluar el impacto de la administración de ambos estimulantes en el mPOA se procedió al estudio de expresión de c-Fos como marcador de activación neuronal como se muestra en la **Figura IV.12**:



**Figure IV.12. Efecto de la temperatura externa sobre la expresión de c-Fos en el mPOA.** Análisis de la expresión de c-Fos en el mPOA 1h luego de la última inyección de MET. Los datos se presentan como número medio de núcleos positivos para c-Fos  $\pm$  SEM (n=5-11). Kruskal-Wallis de dos vías, prueba LSD de Fisher: \* $p < 0.05$  vs. VEH, &  $p < 0.05$  vs. MET, #  $p < 0.05$  vs mismo tratamiento a 22°C. Escala (A-L): 50 $\mu$ m.

Como se puede observar:

- No se observaron cambios en la activación de c-Fos en el grupo VEH entre las distintas temperaturas estudiadas.
- A 14°C no se evidenciaron cambios de activación del mPOA para ningún tratamiento.
- A 29°C se observó activación en los grupos MET y M+M, grupos que además mostraron valores de temperatura máxima dentro del rango febril.
- A 22°C se observó la activación del mPOA en el grupo M+M.

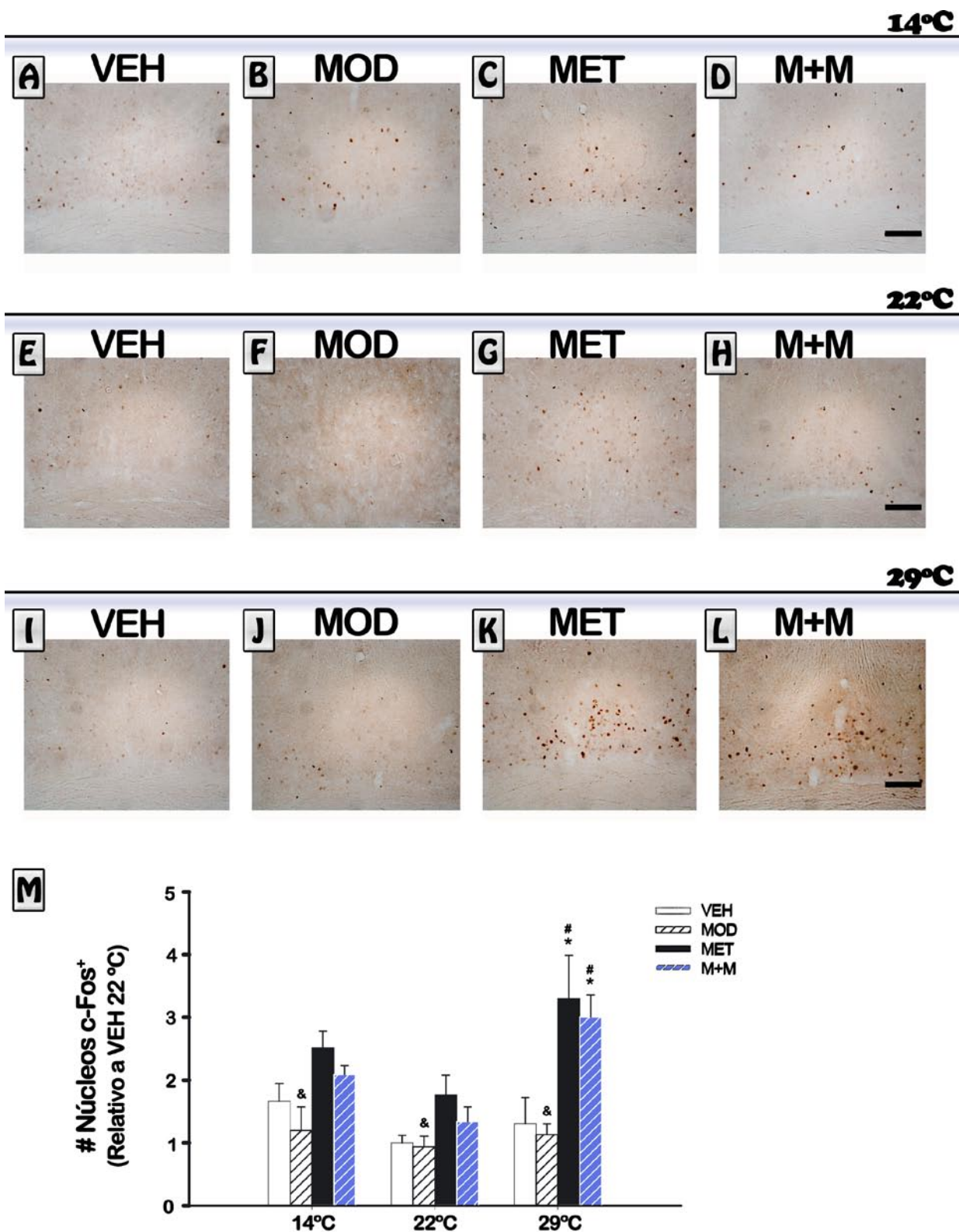
Debido al hecho de que no es posible diferenciar si se están activando neuronas sensibles al frío o al calor, nos propusimos evaluar la activación neuronal en el MnPO, área mayormente involucrada en la inhibición de mecanismos relacionados con la termogénesis.

#### ***b. Expresión de c-Fos en el MnPO (Núcleo Preóptico Mediano)***

El MnPO se encuentra formando parte del Área Preóptica hipotalámica (POA). Recibe información térmica de la piel a través del LPBel (Núcleo parabraqueal lateral externo), el cual lo activa en condiciones de frío. El LPBel media la inhibición de neuronas del POA que inhiben tónicamente al núcleo rostral medular de Rafe y al Hipotálamo dorsomedial, ambas relacionadas con la termogénesis (Nakamura y Morrison, 2008a y 2008b). En síntesis, esto quiere decir que cuando el MnPO se activa se desinhibe la termogénesis y aumenta la producción de calor.

Del mismo modo, el MnPO y el mPOA también son sensibles a la acción de la PGE<sub>2</sub>, mediador central de la fiebre (Lazarus y cols., 2007; Nakamura y cols., 2000). El receptor de PGE<sub>2</sub> se localiza en el soma y en las dendritas de aquellas neuronas del MnPO y del mPOA que proyectan e inhiben a las áreas termogénicas anteriormente mencionadas. Como este receptor media la inhibición de la respuesta de estas células el resultado final es la desinhibición de las áreas termogénicas y la producción de calor (Madden y cols., 2004, Nakamura y cols., 2000). Con el objeto de evaluar si MOD previene la hipertermia que MET induce interviniendo en la regulación de la termogénesis, se evaluó la expresión de c-Fos en el MnPO como se muestra en la **Figura IV.13**.

- Al igual que en el mPOA, los grupos que se diferencian del vehículo fueron aquellos que recibieron MET a 29°C (MET y M+M).
- A 22°C M+M no se encontró activado como en el caso del mPOA, lo que sugiere que la activación observada en el mPOA no estaría relacionada con la termorregulación.



**Figure IV.13. Efecto de la temperatura externa sobre la expresión de c-Fos en el MnPO.** Análisis de la expresión de c-Fos en el MnPO 1h luego de la última inyección de MET. Los datos se presentan como número medio de núcleos positivos para c-Fos  $\pm$  SEM (n=5-11). ANOVA de dos vías, prueba LSD de Fisher \*  $p < 0.05$  vs. VEH, &  $p < 0.05$  vs. MET, #  $p < 0.05$  vs mismo tratamiento a 22°C. Escala (A-L): 100 $\mu$ m.

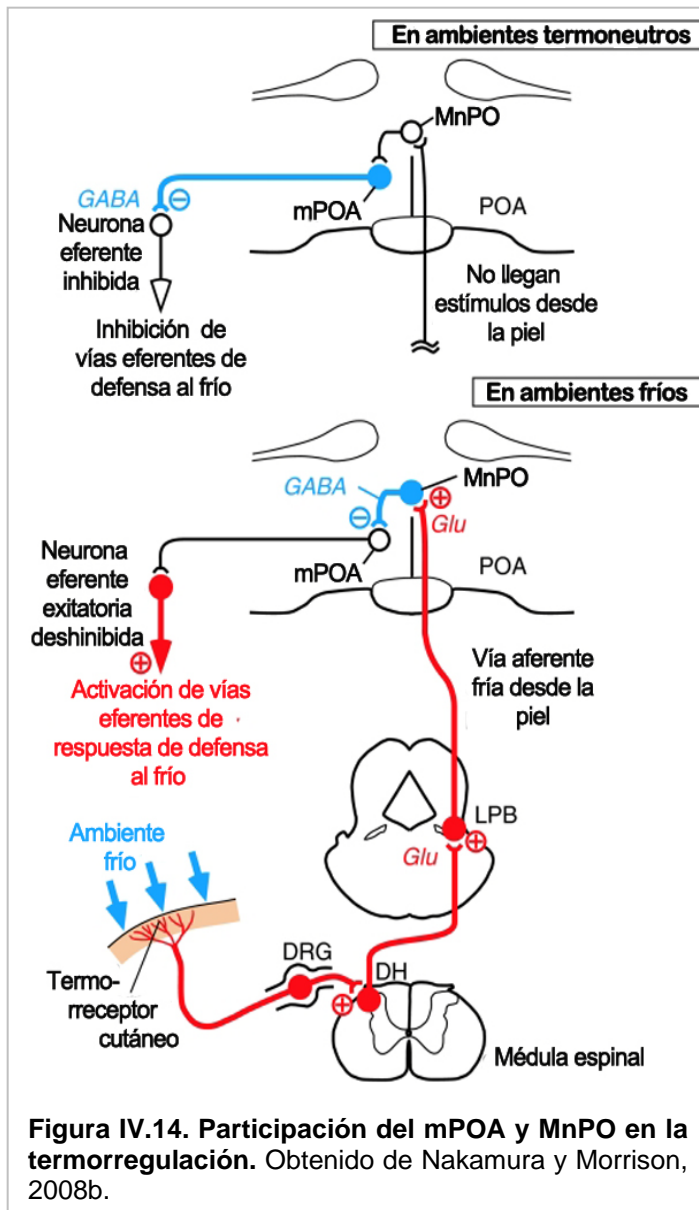
## D. DISCUSIÓN

En el cuarto capítulo de esta tesis estudiamos el impacto de las variaciones de la temperatura corporal sobre el efecto protector de MOD. Los resultados obtenidos indican que la toxicidad dopaminérgica observada luego de un *binge* de MET correlaciona positivamente con la temperatura máxima alcanzada por los animales durante el tratamiento, no así la activación de la astrogliá, la cual se encuentra activa aun en ausencia evidente de daño.

La hipertermia inducida por MET es seguida posteriormente por una respuesta hipotérmica. En el caso de realizar el tratamiento a 29°C la misma permanece incluso 16 horas después de la última inyección de MET y luego de haber pasado la noche en el bioterio del instituto. Este descenso de temperatura podría deberse a una depleción aguda catecolaminérgica o a una desregulación hipotalámica. En cualquier caso, no debería ser considerada una condición de riesgo ya que la hipotermia moderada es uno de los neuroprotectores más estudiados al día de la fecha ante múltiples condiciones clínicas que derivan en daño cerebral (Dietrich y Bramlett 2010, Wu y Grotta 2013).

En el grupo de animales tratados con MET se pudo evidenciar una disminución de los niveles de TH y DAT que correlacionaron con la temperatura corporal máxima durante el tratamiento. Sin embargo, la gliosis reactiva, considerada como un indicador de daño tisular (O'Callaghan y Miller 1993), no correlaciona con la temperatura corporal máxima alcanzada. De hecho, la astrogliá está activada a 14°C aún en ausencia de hipertermia y de alteraciones evidentes en los marcadores de daño de terminales dopaminérgicas (TH y DAT). El hecho de que MOD sea capaz de prevenir la hipertermia inducida por MET a 22°C coincide con la prevención de la toxicidad dopaminérgica observada. No obstante, este no sería el único mecanismo involucrado en la protección ejercida por MOD, ya que aun en condiciones de hipertermia (29°C) MOD todavía es capaz de atenuar el daño inducido por MET. De todos modos, la alteración de los marcadores de terminales dopaminérgicos no correlacionó con la temperatura máxima alcanzada por los animales de este grupo como lo hizo en el grupo MET, descartándose que MOD ejerza su efecto neuroprotector únicamente a través de prevenir la hipertermia. No obstante, en el caso de la activación de GFAP en el grupo M+M se vio que ésta correlaciona positivamente con la temperatura máxima alcanzada por los animales, llegando a niveles de activación comparables a los de MET a 29°C. Finalmente, MOD no indujo hipertermia a ninguna de las temperaturas estudiadas ni alteraciones en los marcadores de

terminales dopaminérgicas. Sin embargo, MOD indujo una leve activación astrocitaria a bajas temperaturas.



**Figura IV.14. Participación del mPOA y MnPO en la termorregulación.** Obtenido de Nakamura y Morrison, 2008b.

En lo que respecta al estudio del hipotálamo anterior y su relación con la hipertermia inducida por MET, nos centramos en el estudio de dos áreas vinculadas con la termogénesis como lo son el mPOA y el MnPO, ambas pertenecientes al POA. El MnPO contiene principalmente neuronas gabaérgicas que proyectan a zonas del mPOA y es activado a través de neuronas del LPBeI (núcleo lateral parabrancúeal, lateral externo) por estímulos fríos sobre receptores cutáneos. El mPOA contiene principalmente neuronas sensibles al calor, tónicamente activas, encargadas de mantener el tono inhibitorio sobre el hipotálamo dorsomedial (DMH) y núcleo de Rafe pálido (rRPa), áreas que facilitan la termogénesis (Ver **Figura IV.14**, Nakamura y Morrison 2008b).

Si bien la exposición a ambientes fríos es efectiva para inducir la expresión de c-Fos en el MnPO y en la región medial del

mPOA, la exposición a ambientes calurosos también es capaz de inducir una leve activación de c-fos en el MnPO y una mayor respuesta en la parte lateral del mPOA (Bratincsak y cols., 2004).

El POA es también conocido como el "centro de la fiebre" ya que el mPOA y el MnPO contienen receptores EP3 (Nakamura y cols., 2011), activados por la unión a PGE2 (Scammell y cols., 1996). La mayor unión de PGE2 a estos receptores también ha mostrado ser máxima en esta área (Matsumura y cols., 1990), es interesante notar que la expresión de PGE2 se

produce en todo el cerebro pero su participación en la inducción de la fiebre se encuentra limitada a estos núcleos hipotalámicos (Scammell y cols., 1996 y 1998). Cabe destacar que durante el desarrollo de la respuesta febril a LPS se ha observado un aumento en la expresión de c-Fos en el MnPO y que la expresión de este marcador colocaliza con aquellas neuronas que expresan el receptor a PGE (Oka y cols., 2000)

En el desarrollo de la "respuesta febril" los pirógenos endógenos actúan sobre las células del endotelio incrementando la expresión de la COX-2 (Cao y cols., 2001; Rummel y cols., 2006) y la síntesis de PGE<sub>2</sub> (Scammell y cols., 1996). Se cree que los macrófagos perivasculares contribuyen a la síntesis de PGE-2 ya que también poseen la enzima la que incrementa su expresión ante estímulos inflamatorios (Konsman y cols., 2004, Schiltz y cols., 2002). Así como MET es capaz de inducir la expresión de COX-2 en el estriado (Thomas y Kuhn 2005) y de marcadores de inflamación (presentes resultados, capítulo II) en el estriado, del mismo modo podría estar activando estos mismos mediadores en el hipotálamo, contribuyendo así a la hipertermia. De todos modos serán necesarios más estudios para delucidar esta hipótesis.

En lo que respecta al gen *c-fos*, el mismo es un gen de activación temprana y la vida media de la proteína expresada (c-Fos) es de aproximadamente 1 hora (kruijer y cols., 1984). Al estudiar la expresión de c-Fos en animales que fueron ingresados a la sala termostaticada 10 horas antes de ser sacrificados estuvimos evaluando principalmente las variaciones en la activación de este gen principalmente a causa del tratamiento. Como puede observarse en el capítulo de resultados, tanto el mPOA como el MnPO resultaron activarse en los grupos que recibieron MET a 29°C. Como la activación del MnPO desencadena mecanismos que obran a favor del control de la temperatura se podría hipotetizar que a 29°C el hipotálamo estaría activándose como respuesta a la hipertermia. Esto se condice con el hecho de que los animales pertenecientes a estos grupos mostraron temperaturas dentro del rango febril, lo que no sucedió a 22°C. No podemos afirmar que la expresión de c-Fos en el hipotálamo no sea una consecuencia de la hipertermia más que un mecanismo responsable de la misma.

Tanto MOD como MET inducen la activación de c-Fos en el estriado (Fiocchi y cols., 2009, Jedynek y cols., 2012). Dicha expresión ha mostrado correlacionar con la distancia recorrida por los animales tratados con MET (Caster y Kuhn, 2009; Rhodes y cols., 2005) y estaría relacionada con el aumento de metabolismo periférico y la consecuente generación de calor que deriva del mismo. De hecho, la hipertermia ocurre en simultáneo con el aumento de la

actividad locomotora y la expresión de conductas estereotipadas. En nuestro caso, de los grupos que recibieron MET la activación de c-Fos fue menor a 14°C y no se vio aumentada a 29°C respecto de lo observado a 22°C. Sería interesante estudiar si esta menor activación de c-Fos a 14°C se correlaciona con una menor respuesta locomotora inducida por MET y por ende y a la ausencia de respuesta hipertérmica inducida por MET a esta temperatura.

En el caso de los animales tratados con MOD no observamos hipertermia ni cambios en el nivel de activación de c-Fos en el estriado al variar la temperatura externa. No obstante, sí se observa una mayor activación respecto del grupo VEH en concordancia con lo descrito por Simon y cols. (1995). Más aún, la administración de MOD no fue capaz de contrarrestar la activación de c-Fos inducida por MET a ninguna temperatura. Esto podría estar relacionado con el aumento de estereotipias observado luego de la administración de ambos estimulantes (Capítulo I) ya que las estereotipias son un empeoramiento de la función motora.

Finalmente, en el último experimento de este capítulo se evaluó la expresión de FosB en el StLd a las tres temperaturas de estudio. Como fue mencionado en el Capítulo II el aumento de expresión de este marcador al tiempo estudiado podría ser indicativo de respuestas neuroprotectoras frente al daño inducido por MET. Lo que encontramos fue un aumento en la expresión de FosB relativo al control en los grupos MET a 22°C y a 29°C que MOD no es capaz de prevenir. Del mismo modo hallamos que el tratamiento con MOD no altera la expresión de FosB a ninguna de las temperaturas evaluadas lo que podría ser indicativo de que MOD no induce toxicidad según nuestro protocolo de administración (Raineri y cols., 2011, Raineri y cols., 2012). Y, en último lugar cabe mencionar que ninguno de los tratamientos a 14°C indujo la expresión de FosB, lo que se condice con la ausencia de alteraciones en los marcadores de toxicidad estudiados a esta temperatura en todos los tratamientos.

En síntesis, nuestros resultados coinciden con el hecho de que el aumento de la temperatura corporal correlaciona con la exacerbación de la toxicidad dopaminérgica inducida por MET. Cuando el tratamiento es administrado a temperaturas altas MOD no fue capaz prevenir la hipertermia pero si de atenuar el daño inducido por MET. Este hecho nos lleva a concluir que parte del mecanismo neuroprotector de MOD frente a toxicidad dopaminérgica inducida por MET es debido a su capacidad de prevenir la hipertermia inducida por MET.



## INTEGRACIÓN FINAL

Dentro de las terminales sinápticas la DA se encuentra principalmente almacenada en vesículas (pool vesicular) o, en caso de haber sido recientemente sintetizada, libre en el citoplasma (pool citoplasmático) (Siden y cols., 1993b). Luego de ser sintetizada, la DA ingresa a la vesícula intercambiada por un  $H^+$  a través del transportador VMAT-2, el cual se expresa en neuronas monoaminérgicas del SNC y periférico (Eiden y Weihe 2011). Una vez dentro de la vesícula, la DA se carga positivamente como consecuencia del bajo pH de la vesícula respecto del pH citoplasmático (5,6 vs. 7,1 respectivamente) por ser una base débil ( $pK_a = 8,33$  a  $37^\circ C$ , Armstrong y Barlow 1976) produciéndose el atrapamiento iónico de la misma (Siden y cols., 1993b).

El pool vesicular se divide a su vez en la fracción asociada a membrana, VMAT-2M, y la citoplasmática no asociada a membrana, VMAT-2C. Las vesículas VMAT-2M poseen una cinética de captación de DA de tipo sigmoidea, pudiendo captar más DA que una vesícula citoplasmática cuya cinética de captación es saturable y de tipo Michaelis-Menten (Fleckenstein, 2009).

La liberación de DA puede ocurrir por exocitosis de vesículas en respuesta a un estímulo despolarizante o a través del DAT cuando la dirección de transporte se encuentra invertida. Normalmente el DAT se encarga de recaptar la DA de la hendidura sináptica para poner fin a su acción siguiendo una cinética de captación de DA de tipo *Michaelis-Menten* la cual varía con la temperatura. Este transporte es activo, dependiente de  $Na^+$  y la dirección de transporte depende de las concentraciones de DA a ambos lados de la célula (Siden y cols., 1993b).

La liberación de DA es regulada en parte por el auto-receptor inhibitorio de dopamina de tipo D2 (D2R) ubicado en la neurona presináptica (Schmitz y cols., 2001). La activación del D2R deriva en una mayor recaptación de DA a través del DAT (Mayfield y Zahniser, 2001) y en la redistribución de las vesículas VMAT-2M, con mayor capacidad de almacenamiento que las VMAT-2C, de la membrana hacia el citoplasma. El aumento de vesículas VMAT-2M disponibles para capturar la DA en el citoplasma deriva en una menor concentración de DA citoplasmática libre (Fleckenstein y cols., 2009) y puede inducirse con la administración de agonistas selectivos para el D2R (quinpirole, pramipexole y apomorfina). El uso de bloqueantes del DAT (Ácido amfonélico, metilfenidato o cocaína) también puede inducir la redistribución de

vesículas VMAT-2M hacia la fracción citoplasmática de modo indirecto al inhibir la recaptación de DA y aumentar la DA en la brecha sináptica y unirse al D2R (Brown y cols., 2001; Volz y cols., 2008).

Los compuestos anfetamínicos incrementan los niveles de DA en la sinapsis haciendo uso tanto el VMAT-2 como del DAT. Estos compuestos revierten la dirección de transporte del DAT y del VMAT-2 ya que en su ingreso se intercambian con una molécula de DA observándose un bloqueo de la recaptación de la misma (Volz y cols., 2007a y 2007b). Este hecho resulta importante si se tiene en cuenta que los compuestos anfetamínicos pueden ingresar a la célula a través del DAT o por difusión pasiva pero solo aquellas moléculas de MET que lo hagan a través del DAT invertirán la dirección de transporte y causarán la liberación de DA. Este hecho se puede evidenciar al administrar MET o ANF junto con compuestos que bloquean el DAT (MOD o nomifensina) donde se produce una menor liberación de DA respecto de cuando son administrados sin los bloqueantes del DAT (Raiteri y cols., 1973, Zolkowska y cols., 2009).

Cuando se administra un *binge* de MET (4 mg/kg x4 inyecciones cada 2 horas), luego de las primeras 3 inyecciones se puede observar un leve aumento de DA extracelular en cada inyección y un aumento mucho más grande en la liberación de DA después de la 4ta inyección (O'Dell y cols., 1991). Se cree que, inicialmente, cuando las concentraciones de MET son bajas, el aumento de los niveles sinápticos de DA ocurriría a través del DAT, como consecuencia de la reversión del transportador y a expensas de la DA libre en el citoplasma (pool citoplasmático). En estas condiciones, MET puede ser nuevamente transportada hacia afuera de la célula a través del DAT sin llegar a ingresar hacia adentro de las vesículas (Seiden y cols., 1993b). Luego, ante la administración repetida o de dosis altas de MET, la proporción de moléculas que pueden ingresar a la célula ahora también por difusión pasiva se vuelve significativa por lo que la concentración intracelular de MET aumenta y la probabilidad de que MET ingrese a las vesículas, las deplete e incremente mucho más los niveles de DA libre en el pool citoplasmático (Seiden y cols., 1993b, Sulzer y cols., 1995). Luego, el incremento de DA libre en el citoplasma alcanzará la brecha sináptica a través del DAT cuyo funcionamiento se encuentra invertido.

Análogamente, los efectos tóxicos de MET también serían dependientes del aumento de la concentración de DA libre en el citoplasma o pool citoplasmático de DA. El aumento de DA libre en el citoplasma lleva a la saturación de las enzimas encargadas de su metabolización y a

la oxidación de la misma con la consecuente producción de radicales libres y la inducción de un estado de estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas (Fleckenstein y cols., 2000; La Voile y Hastings 1999). Estimular la síntesis de DA con L-DOPA potencia el efecto tóxico de MET mientras que inhibirla con  $\alpha$ -MPT previene el efecto estimulante, la toxicidad dopaminérgica y la activación de la microglía por parte de MET (Thomas y cols., 2008). Más aún, la producción de especies reactivas del oxígeno promueve la formación de complejos de alto peso molecular entre monómeros de DAT alterando la función del transportador (Baucum y cols., 2004) y prolongando el tiempo en el cual se encuentra invertida la dirección de transporte de DA después de la administración de un *binge* de MET (Kokoshka y cols., 1998).

MET depleta vesículas aumentando drásticamente los niveles citoplasmáticos de DA al mismo tiempo que reduce la disponibilidad de VMAT-2C promoviendo su nitrosilación e inhibiendo la recaptación de DA hacia la vesícula (Eyerman y Yamamoto 2007). La administración de agonistas del D2R (como el quinpirole) o de bloqueantes del DAT (como la cocaína) ayudarían a atenuar el aumento de DA citoplasmático ya que más vesículas VMAT-2M estarían disponibles en el citoplasma para recaptarla dado que ambos tipos de compuestos inducen la redistribución de las mismas. El mayor número de vesículas VMAT-2 en citoplasma (VMAT-2C + VMAT-2M) que van a ser depletadas por MET sumado a la disminución de la recaptación de DA causada por modificaciones en la proteína VMAT-2 podrían derivar en un incremento de DA libre en el citoplasma. De hecho, son los antagonistas selectivos del receptor D2R (eticlopride), quienes evitan que disminuya la recaptación vesicular de DA y la neurotoxicidad inducida por MET (Albers y Sonsalla 1995, Brown y cols., 2002, Hadlock y cols., 2010). Más aun, cuando se administra MET a ratones KO para el D2R, los mismos se muestran resistentes a la neurotoxicidad, a la hipertermia y a la neuroinflamación que la droga provoca (Granado y cols., 2011).

Se sabe que MOD actúa como bloqueante moderado de la recaptación de DA por parte del DAT a las neuronas dopaminérgicas (Schmitt y Reith 2011, Volkow y cols., 2009, Zolkowska y cols., 2009). También se ha propuesto a MOD como un agonista de los receptores D2R (Korotkova y cols., 2007, Qu y cols., 2008) y más específicamente como agonista parcial (Seeman y cols., 2009).

Si bien se presume que el efecto hiperlocomotor de MOD es a causa del bloqueo del DAT, Zolkowska y cols., (2009) mencionan que se necesita una menor liberación de DA en el NAcc

por parte de MOD, comparada con MET, para llegar a los mismos valores de actividad locomotora. A su vez, el efecto hiperlocomotor de MOD no se ve afectado por bloqueo de la síntesis de DA (Lin y cols., 1992) así como tampoco la administración de haloperidol (antagonista selectivo D2R) o la administración de SCH 23390 (antagonista selectivo D1R). Sin embargo, la administración de estos compuestos si interfiere con el efecto locomotor de las anfetaminas (Simon y cols., 1995). A esta evidencia se le suma el hecho de que MOD parecería ejercer su efecto estimulante por un mecanismo distinto al de los estimulantes anfetamínicos, como lo es la disminución del tono inhibitorio debido a una menor liberación de GABA (Tanganelli y cols., 1992, Ferraro y cols., 1996 y 1998).

De los resultados del estudio de la interacción aguda entre ambos estimulantes pudo observarse una mayor expresión de estereotipias y un empeoramiento del cuadro agudo que paradójicamente no se refleja en una mayor toxicidad en el grupo M+M. Esto coincide con lo reportado por Kitanaka y cols., (2012) quienes observaron una mayor expresión de estereotipias al combinar MET con nomifensina, otro bloqueante del DAT. En el trabajo antes citado también se evidenció un menor desarrollo de estereotipias causado por la administración de ANF por compuestos antipsicóticos, comúnmente utilizados en el tratamiento de la esquizofrenia, cuya función es antagonizar los receptores D2R.

Por otro lado, se ha sugerido que la oxidación de la DA liberada podría servir como señal neuronal para inducir la activación de las células de la microglía. Estas células contribuirían a agravar el cuadro a través de la liberación de compuestos pro-inflamatorios y especies reactivas del oxígeno (LaVoie y cols., 2004, Thomas y cols., 2004). Resulta interesante resaltar que la inhibición de la síntesis de DA previa a la administración de MET previene la activación de la microglía así como la administración de L-DOPA, precursor de la síntesis de DA, exagera la activación de la microglía y la toxicidad inducida por MET (Thomas y cols., 2008). Ni la administración de compuestos que bloquean el DAT (cocaína, nomifensina, WIN 35428), ni la administración de agonistas selectivos para el D1R (SKF 82958), el D2R (quinpirole) o agonistas mixtos D1R/D2R (apomorfina) mostraron activar la microglía en el estriado (Thomas y cols., 2004). Por otro lado, la activación de la microglía se puede atenuar con minociclina, un antibiótico con propiedades anti-inflamatorias, pero la misma no resulta ser suficiente para mitigar por completo la neurotoxicidad inducida por MET (Sriram y cols., 2006). Una posible explicación es que si bien la microglía luego de la administración de MET está siendo inhibida por la minociclina, MET aún es capaz de ingresar a la célula e incrementar la DA libre en el

citoplasma la que continuaría oxidándose. Por ende, la toxicidad neuronal inducida por MET se vería atenuada, dado que la microglía no estaría contribuyendo al daño, pero no inhibida del todo.

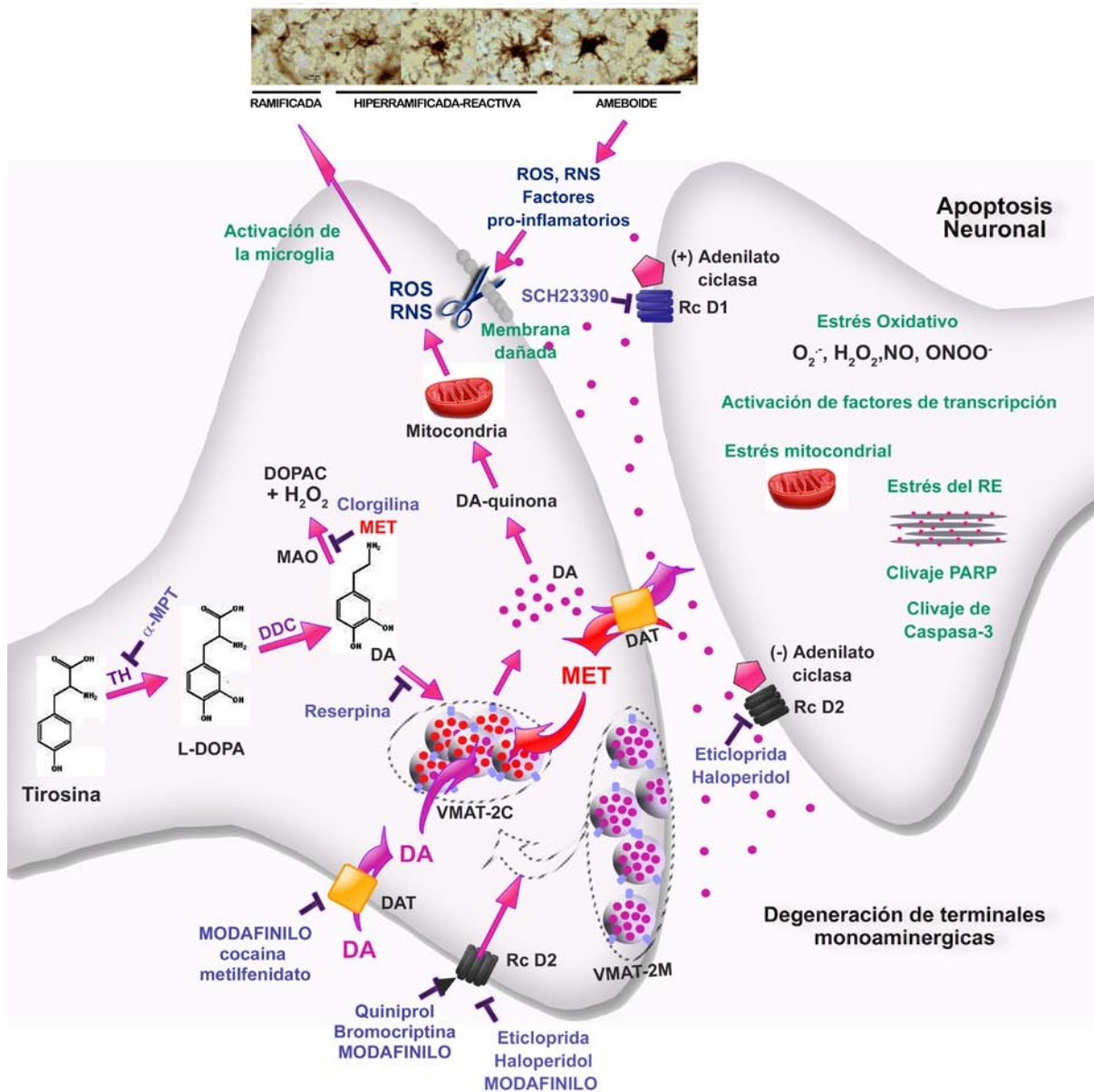
El consumo de MET puede inducir estados de psicosis en humanos. Esta alteración se caracteriza frecuentemente por delirios de tipo paranoide y alucinaciones auditivas que pueden persistir aun cuando el consumo de MET haya sido discontinuado (Grelotti y cols., 2010). Por un lado, se ha propuesto que existe una relación entre el aumento de la transmisión dopaminérgica en el estriado y el desarrollo de psicosis en pacientes con esquizofrenia (Egerton y cols., 2013). A su vez, la activación de las células de la microglía también es un hallazgo común en pacientes que padecen esquizofrenia (Fillman y cols., 2013a y 2013b). Es por esto que la administración de antagonistas del receptor D2R (antipsicóticos) es útil en el tratamiento de esta patología no sólo porque bloquean la acción de la DA sobre los receptores D2 sino porque además mostraron poseer propiedades anti-inflamatorias (Kato y cols., 2011). Resulta interesante resaltar que MOD, al igual que los antipsicóticos y contrario a lo observado con los bloqueantes del DAT, previene la activación de la glía por parte de MET.

Finalmente, se cree que la hipertermia inducida por MET contribuye a la aceleración de procesos oxidativos y a potenciar la neurodegeneración (LaVoie y Hastings 1999). El grado de hipertermia varía con la dosis de MET y la temperatura a la cual se realiza el tratamiento (Sabol y cols., 2013). En el caso de MET, los antagonistas D2R como el haloperidol (Bowyer y cols., 1994) y el eticlopride contrarrestan el efecto hipertérmico siempre que el tratamiento no sea administrado a altas temperaturas (Broening y cols., 2005), tal como se observa con MOD. Más aún, la administración de MET a ratones KO para D2R no induce hipertermia aún cuando el tratamiento se realiza a altas temperaturas (Granado y cols., 2011). Sumado a lo anterior, el tratamiento con Eticlopride (antagonista D2) previene la formación de complejos del DAT, la disminución de la inmunorreactividad para VMAT-2 y la astrogliosis (Hadlock y cols., 2010). Eticlopride, al igual que MOD, previene la hipertermia y la depleción dopaminérgica inducida por MET cuando el tratamiento se realiza a temperaturas ideales pero no a temperaturas elevadas (Broening y cols., 2005). Sin embargo, así como la prevención de la inflamación no es suficiente para evitar la neurotoxicidad inducida por MET, evitar la hipertermia tampoco resulta suficiente. Esto puede evidenciarse al administrar MET después de depletar vesículas de DA con reserpina y aumentar el contenido de DA citoplasmática. En este caso la toxicidad

dopaminérgica se encuentra exacerbada aún en condiciones de hipotermia (Albers y Sonsalla 1995, Thomas y cols., 2008).

Entre los efectos posibles efectos adversos ocasionados por MOD se encuentra el desarrollo de psicosis (Vorspan y cols., 2005, Wu y cols., 2008), probablemente a causa de su acción como bloqueante del DAT y el consecuente aumento de DA extracelular (Zolkowska y cols., 2009). Basándonos en la evidencia que se apoya en el hecho de que los estimulantes son capaces de activar genes de expresión temprana en el estriado (Nestler y cols., 2001), quisimos evaluar el efecto de ambos estimulantes por separado sobre la expresión de estos marcadores. Si bien ambos estimulantes por separado indujeron la activación de c-Fos en el estriado pudimos observar que MOD no fue capaz de disminuir la activación neuronal inducida por MET a sus propios niveles. Si la activación de las neuronas gabaérgicas del estriado fuera dependiente de la DA que está siendo liberada y la consecuente activación de los receptores dopaminérgicos ((Beauvais y cols., 2010), entonces MOD induciría una menor liberación de DA pero no estaría previniendo la liberación de DA inducida por MET, en concordancia a lo reportado por Zolkowska (2009). A su vez este efecto no estaría relacionado con el agonismo parcial de MOD sobre los receptores D2R ya que de haber sido así hubiéramos esperado que la activación de c-Fos en el grupo M+M alcanzara valores comparables a los de MOD.

Los resultados obtenidos en esta tesis se apoyan en la teoría de que MOD actúa como un agonista parcial de los receptores de tipo D2R, mostrando un comportamiento de dualismo competitivo frente a niveles elevados de DA inducidos por MET. Esto quiere decir que cuando las concentraciones de DA son bajas, MOD actúa como agonista pero con una actividad intrínseca inferior a la del agonista puro (DA). Por otro lado, cuando las concentraciones de DA son elevadas, MOD actúa antagonizando el efecto máximo alcanzable por el agonista puro al competir con el mismo por la unión al receptor (Goodman y Gilman., 2003). MOD muestra los efectos benéficos observados por otros autores al administrar antagonistas D2R junto con MET ya que previene el daño dopaminérgico, la respuesta hipertérmica a MET y la inflamación estriatal inducidos por MET. Nuestra hipótesis, como se muestra en la **Figura A**, es que MOD evitaría la activación de los D2R y la consecuente redistribución de vesículas VMAT-2M hacia la fracción citoplasmática disminuyendo la disponibilidad de las mismas para ser depletadas por MET. Así, la liberación de DA en el citoplasma sería menor y la formación de sustancias reactivas del oxígeno y nitrógeno se verían atenuadas. De este modo, al no desencadenarse procesos oxidativos, la activación de las células de la glía no se llegaría a producir.



**Figura A. Esquema representativo del hipotético modo de acción neuroprotectora de MOD.** MET ingresa a la célula y desplaza la DA desde las vesículas hacia el citoplasma e inhibe la MAO, lo que deriva en la metabolización de DA libre por vías no enzimáticas. La oxidación de DA deriva en la producción de sustancias potencialmente tóxicas como la dopamina quinona que disrumpe la función mitocondrial y lleva a la célula a un estado de estrés oxidativo por la producción de radicales libres del oxígeno (ROS) y el nitrógeno (RNS). Estos compuestos en su conjunto dañan a las membranas y al ADN e inducen la apoptosis. Todos estos procesos inducen una respuesta inflamatoria en la cual se produce la activación de las células de la microglía, las cuales contribuyen mediante la liberación de agentes proinflamatorios al daño de las terminales dopaminérgicas. MET invierte la dirección de transporte del DAT siendo la DA citoplasmática liberada al espacio sináptico, encontrándose disponible para activar los receptores D2R. La activación de estos receptores induce la redistribución de vesículas asociadas a membrana (VMAT-2M) al citoplasma y en consecuencia más vesículas se encuentran disponibles para ser depletadas por MET lo que empeora el cuadro. MOD, estaría ejerciendo su efecto protector mediante el bloqueo del DAT y el agonismo parcial de los receptores D2R. De este modo, menos moléculas de MET podrían ingresar a la célula, menos DA sería liberada al espacio extracelular y menos vesículas serían depletadas por MET.

## CONCLUSIONES

De este trabajo de tesis se desprenden las siguientes conclusiones:

- La administración de MOD previno la toxicidad dopaminérgica inducida por MET en el estriado dorsal tanto de ratones macho como de ratones hembras.
- La administración de MOD por si sola no indujo alteraciones sobre los marcadores de toxicidad dopaminérgica estudiados cuando el mismo fue administrado a una dosis de 90 mg/kg. Ante la administración de dosis más altas (180mg/kg), no obstante, se evidenció una disminución en la inmunomarcación para TH.
- Tanto MOD como MET, administrados por separado, fueron capaces de inducir hiperlocomoción. No obstante, el perfil de respuesta locomotora es diferente ya que MOD posee un componente básicamente locomotor y MET un componente mixto (locomotor que altas dosis puede derivar en la realización de estereotipias).
- MOD no previno la expresión de estereotipias inducida por MET.
- La administración de MET indujo un aumento del grado de activación neuronal estriatal determinado por la expresión de c-Fos. La administración de MOD también indujo la activación de este marcador pero a menores niveles que los observados con el tratamiento con MET y no fue capaz de prevenir el aumento de expresión de c-Fos inducido por MET.
- El tratamiento tóxico con MET indujo la activación de la astrogliá y de la microgliá en el estriado. La coadministración de MOD, sin embargo, resultó ser efectiva en prevenir dicha alteración. MOD no indujo la activación de la gliá.
- La administración de MOD fue capaz de prevenir el aumento de expresión de la proteína pro-apoptótica BAX y la disminución de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 inducida por MET. MOD por si solo no alteró la expresión de estas proteínas.
- La administración de MOD no previno el aumento de la expresión de FosB observada luego de la administración de MET.



- MOD no indujo hipertermia a ninguna de las temperaturas estudiadas ni alteraciones en los marcadores de terminales dopaminérgica.
- MET produjo un aumento de la temperatura corporal la cual correlaciona con la exacerbación de la toxicidad dopaminérgicas. La prevención de la hipertermia inducida por MET no sería el único mecanismo mediante el cual MOD ejercería su acción neuroprotectora.

# Apéndice I

## Construcción y uso de macros para la automatización de la cuantificación de imágenes mediante el uso del software ImageJ

### A. INTRODUCCIÓN

Con el propósito de automatizar la cuantificación de las fotos obtenidas mediante el uso cámara acoplada al microscopio de campo claro se procedió al uso de macros. Un macro es una serie de instrucciones que el programa realiza de manera secuencial mediante una única orden de ejecución y que permite la automatización de tareas repetitivas. De este modo, mediante la automatización de la cuantificación, el procedimiento de la cuantificación es independiente de errores de sesgos que el operador pueda aportar.

### B. METODOLOGÍA

Para la cuantificación de las imágenes se utilizaron de manera secuencial los siguientes macros:

#### i. Corrección de la iluminación

Macro 1: Corrección de background
<pre>title = getTitle(), imageCalculator("Subtract create", title,"Background.jpg"), //run("Image Calculator...", "image1=title operation=Subtract image2=Background.jpg create"), run("Save", "save=[H:\\CARPETA\\" +title+ "]"), close(), selectWindow(title), run("Open Next"),</pre>

#### ii. Ajuste de la escala de densidad óptica

Macro 2: MAX y MIN gris
<pre>title = getTitle(), for (i=title, i&lt;n, i++) { run("Measure"), run("Open Next"),}</pre>

Macro 3: LUT
<pre>title = getTitle(), for (i=title, i&lt;n, i++) { run("Window/Level..."), setMinAndMax(valor min, valor max), run("Apply LUT"), run("Save"), run("Open Next"),}</pre>

## iii. Determinación del valor umbral de densidad óptica a utilizar

Macro 4: Umbral
<pre>title = getTitle(), for (i=title, i&lt;n, i++) { setAutoThreshold(), run("Calibrate...", "function=[Uncalibrated OD] unit=[Gray Value] text1= text2="), close(), run("Measure"), run("Open Next"), }</pre>

## iv. Medición de la DOI

Macro 5: Medida DOI
<pre>title = getTitle(), for (i=title, i&lt;n, i++) { setThreshold(0, 161), makeOval(732, 940, 908, 952), run("Calibrate...", "function=[Uncalibrated OD] unit=[Gray Value] text1= text2="), run("Measure"), run("Open Next"), }</pre>

## Apéndice II

### Aproximación a los cambios electrofisiológicos inducidos por metanfetamina, modafinilo y la combinación de ambos estimulantes.

#### A. INTRODUCCIÓN

De modo de corroborar el efecto protector de MOD frente a la neurotoxicidad inducida por MET desde una perspectiva más funcional nos propusimos evaluar los cambios de plasticidad sináptica a corto plazo través del estudio de pulsos pareados.

La plasticidad sináptica puede ser a corto plazo como es el caso de la facilitación por pulsos pareados (PPF) y la depresión por pulsos pareados (PPD); o a largo plazo como es el caso de la potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD); según lo reportado por Henning (2013). Es ampliamente aceptado que la plasticidad por pulsos pareados es debida a cambios en el patrón de actividad de las terminales presinápticas. En el PPF el número de vesículas liberado en respuesta al segundo de dos estímulos administrados cercanos en el tiempo depende de la actividad sináptica. Una de las hipótesis más aceptadas es la del nivel de calcio residual proveniente del primer estímulo que, sumado al calcio ingresado en el segundo estímulo, incrementa la liberación del neurotransmisor facilitando la fusión de más vesículas a la membrana (Firobante y Regehr, 2011; Henning, 2013). En el caso del PPD los mecanismos subyacentes no han sido del todo clarificados pero se cree que tanto la depleción de las vesículas, la inactivación de canales de calcio o la activación de receptores presinápticos pueden contribuir al desarrollo de este fenómeno (Firobante y Regehr, 2011; Henning, 2013). Sin embargo, se suele observar que aumentos en la cantidad de neurotransmisor durante la primera respuesta a los pulsos pareados reduce la amplitud de la segunda respuesta. De este modo tanto la facilitación como la depresión de la respuesta al segundo estímulo son dos procesos que pueden ocurrir en simultáneo. Del balance de estos dos fenómenos dependerá la cantidad final de neurotransmisor liberada.

Se sabe que entre las células que componen el estriado el mayor porcentaje de las mismas son neuronas espinosas medianas (*Medium Spiny Neurons*, MSN; Smith y Bolam 1990) y que reciben aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza (Calabresi y cols., 1996) y el tálamo (Lapper y Bolam 1992). Las fibras dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra sinapsan colateralmente con las MSN en el estriado modulando modulando la señal excitatoria que llega desde la corteza (Bouyer, 1984). Más aún, existe evidencia de que

los receptores de dopamina D2R están ubicados en las terminales glutamatérgicas que inervan el estriado e inhiben la liberación de glutamato en un posible intento de proteger a las neuronas estriatales de una excitación excesiva (Cepeda y cols., 2001).

En nuestro caso hemos demostrado que el tratamiento con un binge tóxico de MET induce la reducción del contenido estriatal de DA y que la coadministración de MOD es capaz de prevenir esta alteración. Sería lógico pensar que dicha disminución de DA en el grupo tratado con MET debería reflejarse en una menor activación de los receptores D2R ubicados en las terminales presinápticas glutamatérgicas que inervan el estriado. Nuestra hipótesis para este experimento es que, en caso de no haber una súper sensibilización de estos receptores D2R, la disminución de DA estriatal produciría una menor inhibición de la liberación de glutamato. De este modo, en el grupo tratado con MET debería observarse una menor depresión de la primera respuesta de pulsos apareados registrada en las neuronas espinosas medianas frente a la estimulación de los axones córtico-estriatales. Dicho aumento de la primera respuesta disminuiría la amplitud en respuesta al segundo estímulo apareado, disminuyendo por tanto la relación de amplitudes o *paired pulse ratio* (Es decir, la relación de corrientes excitatorias postsinápticas, EPSCs:  $EPSC_2/EPSC_1 < 1$ ).

Es importante resaltar que, debido al reducido número de animales incluidos en el ensayo y a la alta variabilidad de las mediciones, resultó difícil analizar estadísticamente los resultados obtenidos; no obstante, creemos que este grupo de resultados abrió una línea de trabajo que sería interesante continuar.

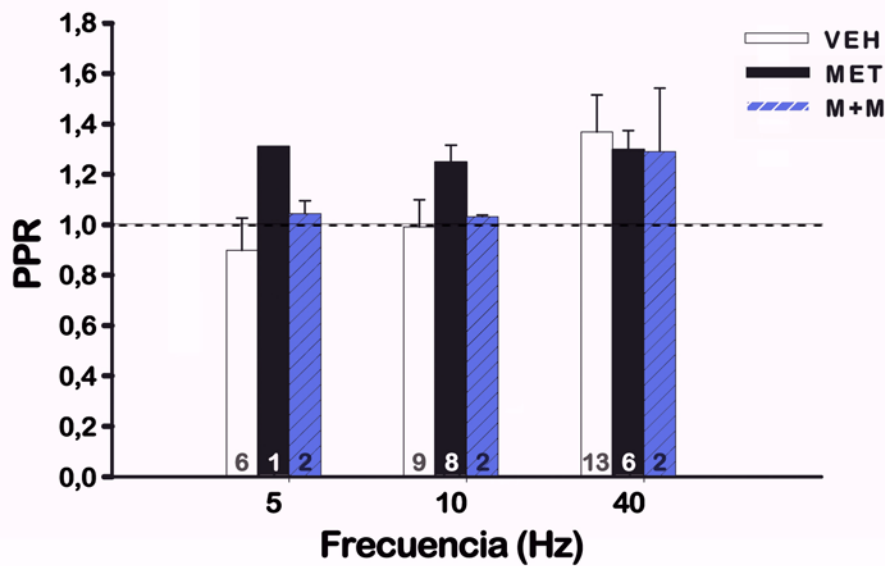
## B. METODOLOGÍA

Fueron realizados en rodajas corticoestriatales de 300  $\mu\text{m}$  de espesor obtenidas mediante cortes sagitales con vibrátomo de cerebros de hembras de la cepa c57/BL-6 de aproximadamente 1 mes de edad. Las rodajas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en solución ACSF normal (Bisagno y cols., 2010) y luego ser transferidas a una cámara montada en la base de un microscopio (BX50WI, Olympus) equipado con un sistema óptico de contraste por interferencia diferencial infrarrojo (IR-DIC). Las neuronas MSN (>95% población neuronal estriatal) se visualizaron con un objetivo 40X de inmersión en agua acoplado a una cámara de video CCD para infrarrojo cercano (IR-1000, DAGE-MTI). Una vez elegida la célula a registrar mediante el uso de microelectrodos con resistencias de 2-4 M $\Omega$  de vidrio borosilicato (Harvard Apparatus, GC150F-15, UK) conectados al cabezal de un amplificador operacional (Multiclamp

700 A, Axon Instruments) se obtuvieron señales de corriente o voltaje analógicas que fueron digitalizadas por un conversor analógico-digital (ADC)-digital analógico (DAC) (Digidata 1322A, Axon Instruments, EEUU). Los registros obtenidos fueron posteriormente analizados con el programa Clampfit 10.2 (PClamp 10, Axon Instruments, EEUU). Para el registro de corrientes sinápticas glutamatérgicas corticoestriatales se usó una solución intracelular de alto Cs<sup>+</sup> (bloqueante de los canales de potasio dependientes de voltaje) más QX-314-Cl (un derivado de lidocaína capaz de bloquear intracelularmente los canales de sodio dependientes de voltaje de la neurona que está siendo registrada). A su vez las corrientes excitatorias post-sinápticas (EPSCs) se registraron tras el bloqueo farmacológico de los receptores de GABA-A agregando Picrotoxina (10 µM) a la solución de registro. Se colocó de forma local en la corteza cercana al StLd un electrodo concéntrico bipolar (FHC Inc, Maine, USA, conectado a una unidad de aislación capaz de administrar una corriente constante 0.1-10 mA de amplitud; 100-200 µs de duración) con el objeto de estimular los axones glutamatérgicos procedentes de la corteza. La estimulación de los axones corticales con pulsos pareados fue comandada por el programa Clampex 10 (pClamp 10, Axon Instruments, CA, USA) a bajas (5 y 10 Hz) y altas (40 Hz) frecuencias. Finalmente se procedió a la cuantificación de los cambios presinápticos de las neuronas registradas comparando el cambio de amplitud del segundo pulso en relación a la amplitud del primero (PPR). Un aumento en el "ratio" implicaría un aumento de la probabilidad de liberación de glutamato durante el segundo pulso, es decir, una facilitación de la liberación del neurotransmisor. Por otro lado, una disminución en la relación de amplitudes generadas por pulsos pareados indicaría una disminución de la probabilidad de liberación glutamatérgica o una depresión.

### C. RESULTADOS

La frecuencia de estimulación de los axones corticales mostrada en la **Figura 1** nos permitiría evidenciar fenómenos de plasticidad sináptica como la facilitación por pulsos pareados (PPF) y la depresión por pulsos pareados (PPD). Como se puede observar en la figura la administración de dos pulsos pareados a 40 Hz (separados 25 mseg entre si) deriva en un aumento en la amplitud de la corriente del segundo pulso respecto del primero (PPF) para todos los grupos de tratamiento, siendo esta una frecuencia de estimulación poco sensible para evaluar los cambios de plasticidad causados por el tratamiento.



**Figura 1. Plasticidad de los pulsos pareados en la sinapsis corticoestriatal 6 días después de la coadministración de MOD junto con un binge de MET.** El potencial de holding de la membrana neuronal fue fijado a  $-70$  mV y la amplitud de los pulsos pareados (PPR:  $EPSC_2/EPSC_1$ ) determinada a distintas frecuencias de estímulo (5, 10 y 40 Hz). Cada célula fue estimulada con pulsos pareados 8 veces a cada una de las frecuencias y cada conjunto de pulsos pareados fue separado entre sí por 30 seg.

Cuando los estímulos se separaban por tiempos más largos (200 msec y 100 msec, resultando en frecuencias de 5 y 10 Hz) se puede observar todavía una tendencia al PPF en el grupo MET, lo que no sucede en el grupo VEH ni en el grupo M+M tratado con ambos estimulantes. Esto podría deberse a la falta del efecto inhibitorio que DA produce sobre la liberación de glutamato en las terminales glutamatérgicas que expresan el receptor D2. Además, de ser cierta esta hipótesis la facilitación observada en el grupo tratado con MET debería corregirse luego de agregar DA, ya sea en el baño donde se está realizando el registro o de forma localizada.

No obstante, e independientemente del mecanismo por el cual se esté produciendo la facilitación de la respuesta a los pulsos pareados, MOD parecería ser capaz de prevenir esta alteración. Hipótesis que esperamos confirmar o refutar en futuros experimentos luego de aumentar el número de registros.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achat-Mendes, C., Ali, S. F., & Itzhak, Y. (2005). Differential effects of amphetamines-induced neurotoxicity on appetitive and aversive Pavlovian conditioning in mice. *Neuropsychopharmacology, Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 30*(6), 1128–37.
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature neuroscience, 10*, 1538–1543.
- Albers, D. S., & Sonsalla, P. K. (1995). Methamphetamine-induced hyperthermia and dopaminergic neurotoxicity in mice: pharmacological profile of protective and nonprotective agents. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275*, 1104–1114.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences, 12*, 366–375.
- Alfonso-Loeches, S., Pascual, M., & Guerri, C. (2013). Gender differences in alcohol-induced neurotoxicity and brain damage. *Toxicology, 311*, 27–34.
- Anderson, A. L., Li, S.-H., Biswas, K., McSherry, F., Holmes, T., Iturriaga, E., & Elkashef, A. M. (2012). Modafinil for the treatment of methamphetamine dependence. *Drug and Alcohol Dependence*.
- Anderson, A. L., Reid, M. S., Li, S., Holmes, T., Shemanski, L., Slee, A., & Elkashef, A. M. (2010). Modafinil for the treatment of cocaine dependence. *Alcohol, 104*(3), 1–14.
- Antelman, S. M., Eichler, A. J., Black, C. A., & Kocan, D. (1980). Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. *Science (New York, N.Y.), 207*, 329–331.
- Aosaki, T., Kimura, M., & Graybiel, A. M. (1995). Temporal and spatial characteristics of tonically active neurons of the primate's striatum. *Journal of neurophysiology, 73*, 1234–1252.
- Armstrong, J., & Barlow, R. B. (1976). The ionization of phenolic amines, including apomorphine, dopamine and catecholamines and an assessment of zwitterion constants. *British Journal of Pharmacology, 57*, 501–516.
- Arnt, J. (1985). Antistereotypic effects of dopamine D-1 and D-2 antagonists after intrastriatal injection in rats. Pharmacological and regional specificity. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 330*, 97–104.
- Atkins, A. L., Helms, M. L., O'Toole, L. A., & Belknap, J. K. (2001). Stereotypic behaviors in mice selectively bred for high and low methamphetamine-induced stereotypic chewing. *Psychopharmacology, 157*, 96–104.
- Ayoub, A. E., & Salm, A. K. (2003). Increased morphological diversity of microglia in the activated hypothalamic supraoptic nucleus. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 23*, 7759–7766.
- Ballon, J. S., & Feifel, D. (2006). A Systematic Review of Modafinil: Potential Clinical Uses and Mechanisms of Action. *Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes, 67*, 554–566.
- Barr, A. M., Panenka, W. J., MacEwan, G. W., Thornton, A. E., Lang, D. J., Honer, W. G., & Lecomte, T. (2006). The need for speed: an update on methamphetamine addiction. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN, 31*, 301–313.
- Bastuji, H., & Jouvet, M. (1988). Successful treatment of idiopathic hypersomnia and narcolepsy with modafinil. *Progress in Neuro-*



- psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 12, 695–700.
- Battisti, J. J., Chang, C. H., Uretsky, N. J., & Wallace, L. J. (1999). Sensitization of stereotyped behavior to amphetamine is context and response dependent. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 63, 263–269.
- Baucum, A. J., Rau, K. S., Riddle, E. L., Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2004). Methamphetamine increases dopamine transporter higher molecular weight complex formation via a dopamine- and hyperthermia-associated mechanism. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24, 3436–3443.
- Beauvais, Geneviève. (2012). *Molecular and cellular bases for the protective effects of dopamine D1 receptor antagonist, SCH23390, against methamphetamine-induced neurotoxicity in the rat brain*. Ecole doctorale du médicament Université Paris Descartes. Retrieved from [http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/69/19/24/PDF/va\\_beauvais\\_genevieve.pdf](http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/69/19/24/PDF/va_beauvais_genevieve.pdf)
- Beauvais, Genevieve, Jayanthi, S., McCoy, M. T., Ladenheim, B., & Cadet, J. L. (2010). Differential effects of methamphetamine and SCH23390 on the expression of members of IEG families of transcription factors in the rat striatum. *Brain Research*, 1318, 1–10.
- Berke, J. D., & Hyman, S. E. (2000). Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, 25, 515–532.
- Betarbet, R., Turner, R., Chockkan, V., DeLong, M. R., Allers, K. A., Walters, J., & Greenamyre, J. T. (1997). Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 17, 6761–6768.
- Bezard, E., Gross, C. E., Fournier, M. C., Dovero, S., Bloch, B., & Jaber, M. (1999). Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Experimental Neurology*, 155, 268–273.
- Bhatt, S. D., & Dluzen, D. E. (2005). Dopamine transporter function differences between male and female CD-1 mice. *Brain Research*, 1035, 188–195. doi:10.1016/j.brainres.2004.12.013
- Bisagno, V., Ferguson, D., & Luine, V. N. (2002). Short toxic methamphetamine schedule impairs object recognition task in male rats. *Brain Research*, 940(1-2), 95–101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020880>
- Bisagno, V., Raineri, M., Peskin, V., Wikinski, S. I., Uchitel, O. D., Llinás, R. R., & Urbano, F. J. (2010). Effects of T-type calcium channel blockers on cocaine-induced hyperlocomotion and thalamocortical GABAergic abnormalities in mice. *Psychopharmacology*, 212, 205–214.
- Black, J. E., & Hirshkowitz, M. (2005). Modafinil for treatment of residual excessive sleepiness in nasal continuous positive airway pressure-treated obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *Sleep*, 28, 464–471.
- Block, M. L., & Hong, J.-S. (2007). Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochemical Society transactions*, 35, 1127–1132
- Boger, H. A., Middaugh, L. D., Patrick, K. S., Ramamoorthy, S., Denehy, E. D., Zhu, H., & McGinty, J. F. (2007). Long-term consequences of methamphetamine exposure in young adults are exacerbated in glial cell line-derived neurotrophic factor heterozygous mice. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27, 8816–8825.
- Boulant, J. A. (1998). Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856, 108–115.
- Boulant, J. A. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clinical Infectious Diseases: an official*

- publication of the *Infectious Diseases Society of America*, 31 Suppl 5, S157–S161.
- Bouyer, J. J., Park, D. H., Joh, T. H., & Pickel, V. M. (1984). Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. *Brain Research*, 302, 267–275.
- Bowyer, J. F., Davies, D. L., Schmued, L., Broening, H. W., Newport, G. D., Slikker, W., & Holson, R. R. (1994). Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268, 1571–1580.
- Bratincsák, A., & Palkovits, M. (2004a). Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure. *Neuroscience*, 127, 385–397. Bratincsák, A., & Palkovits, M. (2004b). Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure. *Neuroscience*, 127, 385–397.
- Brien JF, Kitney JC, & Peachey J. E. (1978). Methamphetamine-induced behavioural effects and brain concentrations of methamphetamine and its metabolite amphetamine in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 22, 313–28.
- Broening, H. W., Morford, L. L., & Vorhees, C. V. (2005). Interactions of dopamine D1 and D2 receptor antagonists with D-methamphetamine-induced hyperthermia and striatal dopamine and serotonin reductions. *Synapse*, 56, 84–93.
- Brookshire, B. R., & Jones, S. R. (2010). Direct and Indirect 5-HT receptor agonists produce gender-specific effects on locomotor and vertical activity in C57 BL/6J mice. *Test*, 94(1), 194–203.
- Brown, J M, Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2001). Cocaine-induced increases in vesicular dopamine uptake: role of dopamine receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298, 1150–1153.
- Brown, Jeffrey M, Riddle, E. L., Sandoval, V., Weston, R. K., Hanson, J. E., Crosby, M. J., & Fleckenstein, A. E. (2002). A single methamphetamine administration rapidly decreases vesicular dopamine uptake. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302, 497–501.
- Busch, A. E., Karbach, U., Miska, D., Gorboulev, V., Akhoundova, A., Volk, C., & Koepsell, H. (1998). Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Molecular Pharmacology*, 54, 342–352.
- Bushong, E. A., Martone, M. E., & Ellisman, M. H. (2004). Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *International Journal of Developmental Neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 22, 73–86.
- Cadet, J. L., Sheng, P., Ali, S., Rothman, R., Carlson, E., & Epstein, C. (1994). Attenuation of methamphetamine-induced neurotoxicity in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*, 62, 380–383.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N. B., & Bernardi, G. (1996). The corticostriatal projection: From synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*.
- Callahan, B. T., Cord, B. J., Yuan, J., McCann, U. D., & Ricaurte, G. A. (2001). Inhibitors of Na(+)/H(+) and Na(+)/Ca(2+) exchange potentiate methamphetamine-induced dopamine neurotoxicity: possible role of ionic dysregulation in methamphetamine neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 77, 1348–1362.
- Canales, J. J., & Graybiel, A. M. (2000). A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nature Neuroscience*, 3, 377–383.

- Cao, C., Matsumura, K., Shirakawa, N., Maeda, M., Jikihara, I., Kobayashi, S., & Watanabe, Y. (2001). Pyrogenic cytokines injected into the rat cerebral ventricle induce cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells and also upregulate their receptors. *The European Journal of Neuroscience*, *13*, 1781–1790.
- Caster, J. M., & Kuhn, C. M. (2009). Maturation of coordinated immediate early gene expression by cocaine during adolescence. *Neuroscience*, *160*, 13–31.
- Centonze, D., Gubellini, P., Bernardi, G., & Calabresi, P. (1999). Permissive role of interneurons in corticostriatal synaptic plasticity. *Brain research. Brain Research reviews*, *31*, 1–5.
- Cepeda, C., Hurst, R. S., Altemus, K. L., Flores-Hernández, J., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Grandy, D., Low, M. J., Rubinstein, M., Ariano, M., Levine, M. S. (2001a). Facilitated glutamatergic transmission in the striatum of D2 dopamine receptor-deficient mice. *Journal of Neurophysiology*, *85*, 659–670.
- Chartoff, E. H., Marck, B. T., Matsumoto, A. M., Dorsa, D. M., & Palmiter, R. D. (2001). Induction of stereotypy in dopamine-deficient mice requires striatal D1 receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*, 10451–10456.
- Chen, J., Kelz, M. B., Hope, B. T., Nakabeppu, Y., & Nestler, E. J. (1997). Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *17*, 4933–4941.
- Chen, X., Whissell, P., Orser, B. a, & Macdonald, J. F. (2011). Functional modifications of Acid-sensing ion channels by ligand-gated chloride channels. *PLoS one*, *6*(7), e21970.
- Cho, A K, Melega, W. P., Kuczenski, R., & Segal, D. S. (2001). Relevance of pharmacokinetic parameters in animal models of methamphetamine abuse. *Synapse (New York, N.Y.)*, *39*, 161–166.
- Cho, Arthur K, & Melega, W. P. (2002). Patterns of methamphetamine abuse and their consequences. *Journal of Addictive Diseases*, *21*, 21–34.
- Ciliax, B. J., Nash, N., Heilman, C., Sunahara, R., Hartney, A., Tiberi, M., & Levey, A. I. (2000). Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse (New York, N.Y.)*, *37*, 125–145.
- Coles, J. A., & Orkand, R. K. (1983). Modification of potassium movement through the retina of the drone (*Apis mellifera* male) by glial uptake. *The Journal of Physiology*, *340*, 157–174.
- Cook CE, Jeffcoat AR, Sadler BM, Hill JM, Voyksner RD, Pugh DE, White WR, P.-R. M. (1992). Pharmacokinetics of oral methamphetamine and effects of repeated daily dosing in humans. *Drug Metab Dispos*, *20*(6), 856–62.
- Cooper, Z. D., Jones, J. D., & Comer, S. D. (2012). Glial modulators: a novel pharmacological approach to altering the behavioral effects of abused substances. *Expert Opinion on Investigational Drugs*.
- Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., & Smith, S. J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science (New York, N.Y.)*, *247*, 470–473.
- Creese, S. D. I. (1974). The role of forebrain dopamine systems in amphetamine induced stereotyped behavior in the rat. *Psychopharmacology*, *34*, 345–357.
- Creese, I. & Iversen, S. D. (1972). Amphetamine response in rat after dopamine neurone destruction. *Nat. New Biol.*, *238*, 247–248.
- Crittenden, J. R., & Graybiel, A. M. (2011). Basal Ganglia disorders associated with imbalances in

- the striatal striosome and matrix compartments. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5, 59.
- Cruz-Muros, I., Afonso-Oramas, D., Abreu, P., Rodríguez, M., González, M. C., & González-Hernández, T. (2008). Deglycosylation and subcellular redistribution of VMAT2 in the mesostriatal system during normal aging. *Neurobiology of Aging*, 29(11), 1702–11.
- Curran T. (1998). c-fos and Signal Transduction In Vivo. *Toxicol In Vitro.*, 12(5), 523–4.
- Czeh, M., Gressens, P., & Kaindl, A. M. (2011). The Yin and Yang of Microglia. *Developmental Neuroscience*.
- Czeisler, C. A., Walsh, J. K., Roth, T., Hughes, R. J., Wright, K. P., Kingsbury, L., & Dinges, D. F. (2005). *Modafinil for excessive sleepiness associated with shift-work sleep disorder. The New England journal of Medicine* (Vol. 353, pp. 476–486).
- D'Souza, D. N., Harlan, R. E., & Garcia, M. M. (2002). Sexually dimorphic effects of morphine and MK-801: sex steroid-dependent and -independent mechanisms. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 92, 493–503.
- Dackis, C. A., Kampman, K. M., Lynch, K. G., Pettinati, H. M., & O'Brien, C. P. (2005). A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil for cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(1), 205–11. d
- Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508, 1–12.
- Davidson, C., Gow, A. J., Lee, T. H., & Ellinwood, E. H. (2001). Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain research. Brain Research Reviews*, 36(1), 1–22.
- Dawson, N., Thompson, R. J., McVie, A., Thomson, D. M., Morris, B. J., & Pratt, J. A. (2012). Modafinil reverses phenocyclidine-induced deficits in cognitive flexibility, cerebral metabolism, and functional brain connectivity. *Schizophrenia Bulletin*.
- De La Garza, R., Zorick, T., Heinzerling, K. G., Nusinowitz, S., London, E. D., Shoptaw, S., Moddy, D., Newton, T. F. (2009). *The cardiovascular and subjective effects of methamphetamine combined with gamma-vinyl-gamma-aminobutyric acid (GVG) in non-treatment seeking methamphetamine-dependent volunteers. Pharmacology, biochemistry, and behavior* (Vol. 94, pp. 186–193).
- De Olmos JS, Beltramino CA, de O. de L. S. (1994). Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia, and physical trauma. *Neurotoxicol Teratol.*, 16(6), 545–61.
- Di Chiara, G. (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behavioural brain research*, 137, 75–114.
- Diaz, J., Pilon, C., Le Foll, B., Gros, C., Triller, A., Schwartz, J. C., & Sokoloff, P. (2000). Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20, 8677–8684.
- Dietrich, W. D., & Bramlett, H. M. (2010). The evidence for hypothermia as a neuroprotectant in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7, 43–50.
- Dluzen, D E, & McDermott, J. L. (2008). Sex differences in dopamine- and vesicular monoamine-transporter functions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139, 140–150. doi:10.1196/annals.1432.010
- Dluzen, D E, McDermott, J. L., & Darvesh, A. S. (2010). Relationships among gender, age, time,

- and temperature in methamphetamine-induced striatal dopaminergic neurotoxicity. *Neuroscience*, 167, 985–993
- Dluzen, D. E. (2004). The effect of gender and the neurotrophin, BDNF, upon methamphetamine-induced neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system in mice. *Neuroscience Letters*, 359, 135–138.
- Dluzen, Dean E, & Liu, B. (2008). Gender differences in methamphetamine use and responses: a review. *Gender medicine* □: *official journal of the Partnership for Gender-Specific Medicine at Columbia University*, 5, 24–35.
- Dluzen, D. E., & Salvaterra, T. J. (2005). Sex differences in methamphetamine-evoked striatal dopamine output are abolished following gonadectomy: comparisons with potassium-evoked output and responses in prepubertal mice. *Neuroendocrinology*, 82, 78–86.
- Egerton, A., Chaddock, C. A., Winton-Brown, T. T., Bloomfield, M. A. P., Bhattacharyya, S., Allen, P., McGuire, P., Howes, O. D. (2013). Presynaptic striatal dopamine dysfunction in people at ultra-high risk for psychosis: Findings in a second cohort. *Biological Psychiatry*, 74, 106–112.
- Eiden, L. E., & Weihe, E. (2011). VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216, 86–98.
- Estler CJ. (1975). Dependence on age of metamphetamine-produced changes in thermoregulation and metabolism. *Experientia*, 31(1975), 1436–1437.
- Eyerman, D. J., & Yamamoto, B. K. (2007). A rapid oxidation and persistent decrease in the vesicular monoamine transporter 2 after methamphetamine. *Journal of Neurochemistry*, 103, 1219–1227.
- Fantegrossi, W. E., Ciullo, J. R., Wakabayashi, K. T., De La Garza, R., Traynor, J. R., & Woods, J. H. (2008). A comparison of the physiological, behavioral, neurochemical and microglial effects of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in the mouse. *Neuroscience*, 151, 533–543.
- Feketa VV, Balasubramanian A, Flores CM, Player MR, M. S. (2013). Shivering and tachycardic responses to external cooling in mice are substantially suppressed by TRPV1 activation but not by TRPM8 inhibition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 305(9), R1040–50.
- Ferraro, L., Antonelli, T., O'Connor, W. T., Tanganelli, S., Rambert, F. a, & Fuxe, K. (1998). The effects of modafinil on striatal, pallidal and nigral GABA and glutamate release in the conscious rat: evidence for a preferential inhibition of striato-pallidal GABA transmission. *Neuroscience letters*, 253(2), 135–8.
- Ferraro, L., Tanganelli, S., O'Connor, W. T., Antonelli, T., Rambert, F., & Fuxe, K. (1996). The vigilance promoting drug modafinil increases dopamine release in the rat nucleus accumbens via the involvement of a local GABAergic mechanism. *European Journal of Pharmacology*, 306(1-3), 33–9.
- Fetler, L; Amigorena, S. (2005). Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science*, 309(2005), 392–93.
- Fillman, S. G., Cloonan, N., Catts, V. S., Miller, L. C., Wong, J., McCrossin, T., & Weickert, C. S. (2012). Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*.
- Fillman SG, Cloonan N, & Miller LC (2013). Markers of inflammation in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Mol Psychiatry.*, 18(2), 133.
- Fiocchi, E. M., Lin, Y. G., Aimone, L., Gruner, J. A., & Flood, D. G. (2009). Armodafinil promotes wakefulness and activates Fos in rat brain. *Pharmacology Biochemistry and*

- Behavior*, 92, 549–557.  
doi:10.1016/j.pbb.2009.02.006
- Fioravante, D., & Regehr, W. G. (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*.
- Fleckenstein, A E, Gibb, J. W., & Hanson, G. R. (2000). Differential effects of stimulants on monoaminergic transporters: pharmacological consequences and implications for neurotoxicity. *European Journal of Pharmacology*, 406, 1–13.
- Fleckenstein, Annette E., Volz, T. J., & Hanson, G. R. (2009). Psychostimulant-induced alterations in vesicular monoamine transporter-2 function: Neurotoxic and therapeutic implications. *Neuropharmacology*.
- Flora, G., Lee, Y. W., Nath, A., Maragos, W., Hennig, B., & Toborek, M. (2002). Methamphetamine-induced TNF- $\alpha$  gene expression and activation of AP-1 in discrete regions of mouse brain - Potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Neuromolecular Medicine*, 2, 71–85.
- Florez J. (2003). Acciones de los fármacos I: Interacciones fármaco y receptor. In *Farmacología Humana* (4ta. ed., pp. 7 – 17). Masson.
- Fowler, S. C., Birkestrand, B., Chen, R., Vorontsova, E., & Zarcone, T. (2003). Behavioral sensitization to amphetamine in rats: changes in the rhythm of head movements during focused stereotypies. *Psychopharmacology*, 170, 167–177.
- Franza, B. R., Rauscher, F. J., Josephs, S. F., & Curran, T. (1988). The Fos complex and Fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science (New York, N.Y.)*, 239, 1150–1153.  
doi:10.1126/science.2964084
- Friedman, S. D., Castañeda, E., & Hodge, G. K. (1998). Long-term monoamine depletion, differential recovery, and subtle behavioral impairment following methamphetamine-induced neurotoxicity. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 61, 35–44.
- Fumagalli, F., Gainetdinov, R. R., Valenzano, K. J., & Caron, M. G. (1998). Role of dopamine transporter in methamphetamine-induced neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 18, 4861–4869.
- Galván, C. (2008). Boom de ventas de dos remedios que se usan para dar exámenes. *Diario Clarín*.
- Garcia-Rill, E., Heister, D. S., Ye, M., Charlesworth, A., & Hayar, A. (2007). Electrical coupling: novel mechanism for sleep-wake control. *Sleep*, 30(11), 1405–14.
- Gerdeman, G. L., Partridge, J. G., Lupica, C. R., & Lovinger, D. M. (2003). It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 26, 184–192.
- Giaume, C, Kirchhoff, F., Matute, C., Reichenbach, A., & Verkhratsky, A. (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death and Differentiation*, 14, 1324–1335.
- Giaume, Christian, Maravall, M., Welker, E., & Bonvento, G. (2009). The barrel cortex as a model to study dynamic neuroglial interaction. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 15, 351–366.
- Giros, B., el Mestikawy, S., Godinot, N., Zheng, K., Han, H., Yang-Feng, T., & Caron, M. G. (1992). Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Molecular Pharmacology*, 42, 383–390.
- Giulian, D., & Baker, T. J. (1985). Peptides released by ameboid microglia regulate

- astroglial proliferation. *The Journal of Cell Biology*, 101, 2411–2415.
- Gluck, M. R., Moy, L. Y., Jayatileke, E., Hogan, K. A., Manzino, L., & Sonsalla, P. K. (2001). Parallel increases in lipid and protein oxidative markers in several mouse brain regions after methamphetamine treatment. *Journal of Neurochemistry*, 79, 152–160.
- Gomes-Leal, W. (2012). Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain and Behavior*, 2, 345–56. doi:10.1002/brb3.51
- Gonçalves, J., Martins, T., Ferreira, R., Milhazes, N., Borges, F., Ribeiro, C. F., & Silva, A. P. (2008). Methamphetamine-induced early increase of IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA expression in the mouse brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139, 103–111.
- Gordon, C. J., Becker, P., & Ali, J. S. (1998). Behavioral thermoregulatory responses of single- and group-housed mice. *Physiology & behavior*, 65, 255–262.
- Gordon CJ. (1993). *Temperature Regulation in Laboratory Rodents*. Cambridge University Press.
- Granado, N., Ares-Santos, S., O’Shea, E., Vicario-Abejón, C., Colado, M. I., & Moratalla, R. (2010). Selective vulnerability in striosomes and in the nigrostriatal dopaminergic pathway after methamphetamine administration: early loss of TH in striosomes after methamphetamine. *Neurotoxicity Research*, 18, 48–58.
- Granado, N., Ares-Santos, S., Oliva, I., O’Shea, E., Martin, E. D., Colado, M. I., & Moratalla, R. (2011). Dopamine D2-receptor knockout mice are protected against dopaminergic neurotoxicity induced by methamphetamine or MDMA. *Neurobiology of Disease*, 42, 391–403.
- Graveland, G. A., & DiFiglia, M. (1985). The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Research*, 327, 307–311.
- Graybiel, A. M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends in neurosciences*, 13, 244–254.
- Graybiel, A. M. (2000). The basal ganglia. *Current Biology*, 10, 509–511.
- Graybiel, A. M., Moratalla, R., & Robertson, H. A. (1990). Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 6912–6916.
- Graybiel, A. M., & Ragsdale, C. W. (1978). Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 5723–5726.
- Green PM, S. M., Green, P. M., & Stillman, M. J. (1998). Narcolepsy. Signs, symptoms, differential diagnosis, and management. *Arch Fam Med.*, 7(5), 472–8.
- Greenberg, M. E., Hermanowski, A. L., & Ziff, E. B. (1986). Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 6, 1050–1057.
- Grelotti, D. J., Kanayama, G., & Pope, H. G. (2010). Remission of persistent methamphetamine-induced psychosis after electroconvulsive therapy: presentation of a case and review of the literature. *The American Journal of Psychiatry*.
- Griffin, W. S. T. (2006). Inflammation and neurodegenerative diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 470S–474S.
- Gulaboski, R., Cordeiro, M. N. D. S., Milhazes, N., Garrido, J., Borges, F., Jorge, M., & Silva, A. F.

- (2007). Evaluation of the lipophilic properties of opioids, amphetamine-like drugs, and metabolites through electrochemical studies at the interface between two immiscible solutions. *Analytical Biochemistry*, 361, 236–243.
- Gunasekar, P. G., Kanthasamy, A. G., Borowitz, J. L., & Isom, G. E. (1995). NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *Journal of Neurochemistry*, 65, 2016–2021.
- Hadlock, G. C., Chu, P.-W., Walters, E. T., Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2010). Methamphetamine-induced dopamine transporter complex formation and dopaminergic deficits: the role of D2 receptor activation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335, 207–212.
- Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., & Haydon, P. G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience, 27, 6473–6477.
- Halpin, L. E., & Yamamoto, B. K. (2012). Peripheral Ammonia as a Mediator of Methamphetamine Neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*.
- Hamamura, T., Akiyama, K., Akimoto, K., Kashihara, K., Okumura, K., Ujike, H., & Otsuki, S. (1991). Co-administration of either a selective D1 or D2 dopamine antagonist with methamphetamine prevents methamphetamine-induced behavioral sensitization and neurochemical change, studied by in vivo intracerebral dialysis. *Brain Research*, 546, 40–46.
- Hanisch, U.-K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10, 1387–1394.
- Hansch C, Leo A, H. D. (1995). *Exploring QSAR: Hydrophobic, electronic, and steric constants*. American Chemical Society. American Chemical Society.
- Hart, C. L., Haney, M., Vosburg, S. K., Rubin, E., & Foltin, R. W. (2008). Smoked cocaine self-administration is decreased by modafinil. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(4), 761–8.
- Harvey, D. C., Laćan, G., & Melegan, W. P. (2000). Regional heterogeneity of dopaminergic deficits in vervet monkey striatum and substantia nigra after methamphetamine exposure. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, 133, 349–358.
- Hashimoto, K., Tsukada, H., Nishiyama, S., Fukumoto, D., Kakiuchi, T., & Iyo, M. (2007). Protective effects of minocycline on the reduction of dopamine transporters in the striatum after administration of methamphetamine: a positron emission tomography study in conscious monkeys. *Biological Psychiatry*, 61, 577–581.
- Heller, A., Bubula, N., Lew, R., Heller, B., & Won, L. (2001). Gender-dependent enhanced adult neurotoxic response to methamphetamine following fetal exposure to the drug. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 298, 769–779.
- Heneka, M. T., Rodríguez, J. J., & Verkhratsky, A. (2010). Neuroglia in neurodegeneration. *Brain research reviews*, 63, 189–211.
- Hennig, M. H. (2013). Theoretical models of synaptic short term plasticity. *Frontiers in computational neuroscience*, 7, 45.
- Herkenham M, P. C. (1981). Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature*, 291(5814), 415–8.
- Herrero MT, Luquin MR, Martín J, de Pablos V, F. V. E. (2012). Anatomía química de los ganglios



- basales. La transmisión dinámica. In *Enfermedad de Parkinson* (pp. 3–21).
- Hersch, S. M., Yi, H., Heilman, C. J., Edwards, R. H., & Levey, A. I. (1997). Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra. *The Journal of Comparative neurology*, *388*, 211–227.
- Holt, D. J., Graybiel, A. M., & Saper, C. B. (1997). Neurochemical architecture of the human striatum. *The Journal of Comparative Neurology*, *384*, 1–25.
- Hotchkiss, A. J., & Gibb, J. W. (1980). Long-term effects of multiple doses of methamphetamine on tryptophan hydroxylase and tyrosine hydroxylase activity in rat brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *214*, 257–262.
- Itzhak, Y., Martin, J. L., & Ali, S. F. (2002). Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in mice: long-lasting sensitization to the locomotor stimulation and desensitization to the rewarding effects of methamphetamine. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, *26*, 1177–1183.
- Jasinski DR, & Kovacevic-Ristanovic, R. (2000). Evaluation of the abuse liability of modafinil and other drugs for excessive daytime sleepiness associated with narcolepsy. *Clin Neuropharmacol.*, *23*(3), 149–56.
- Jayanthi, S, Ladenheim, B., & Cadet, J. L. (1998). Methamphetamine-induced changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in copper/zinc-superoxide dismutase transgenic mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *844*, 92–102.
- Jayanthi S, Ladenheim B, C. J. (1998). Methamphetamine-induced changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in copper/zinc-superoxide dismutase transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci.*, *30*(844), 92–102.
- Jayanthi, Subramaniam, Deng, X., Noailles, P.-A. H., Ladenheim, B., & Cadet, J. L. (2004). Methamphetamine induces neuronal apoptosis via cross-talks between endoplasmic reticulum and mitochondria-dependent death cascades. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *18*, 238–251.
- Jedynak, J. P., Cameron, C. M., & Robinson, T. E. (2012). Repeated Methamphetamine Administration Differentially Alters Fos Expression in Caudate-Putamen Patch and Matrix Compartments and Nucleus Accumbens. *PLoS ONE*.
- Jedynak, J. P., Uslander, J. M., Esteban, J. A., & Robinson, T. E. (2007). Methamphetamine-induced structural plasticity in the dorsal striatum. *The European Journal of Neuroscience*, *25*, 847–853.
- Jeng, W., Ramkissoon, A., Parman, T., & Wells, P. G. (2006). Prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation of amphetamines to free radical intermediates that cause CNS regional DNA oxidation and nerve terminal degeneration. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *20*, 638–650.
- Jiang, Q., DeTolla, L., van Rooijen, N., Singh, I. S., Fitzgerald, B., Lipsky, M. M., & Hasday, J. D. (1999). Febrile-range temperature modifies early systemic tumor necrosis factor alpha expression in mice challenged with bacterial endotoxin. *Infection and Immunity*, *67*, 1539–1546.
- Joel, D., & Weiner, I. (2000). The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience*, *96*, 451–474.
- Kalant, H. (2001). The pharmacology and toxicology of “ecstasy” (MDMA) and related drugs. *CMAJ: Canadian Medical Association journal. Journal de l'Association medicale canadienne*, *165*, 917–928.

- Kalechstein AD, De La Garza R 2nd, N. T. (2010). Modafinil administration improves working memory in methamphetamine-dependent individuals who demonstrate baseline impairment. *Am J Addict.*, 19(4), 340–4.
- Kato, T. A., Monji, A., Mizoguchi, Y., Hashioka, S., Horikawa, H., Seki, Y., Kasai, M., Utsumi, H., Kanba, S. (2011). Anti-Inflammatory properties of antipsychotics via microglia modulations: are antipsychotics a “fire extinguisher” in the brain of schizophrenia? *Mini reviews in Medicinal Chemistry*, 11, 565–574.
- Kaushal, N., Seminerio, M. J., Robson, M. J., McCurdy, C. R., & Matsumoto, R. R. (2012). Pharmacological evaluation of SN79, a sigma ( $\sigma$ ) receptor ligand, against methamphetamine-induced neurotoxicity in vivo. *European Neuropsychopharmacology*.
- Kelly, K. a, Miller, D. B., Bowyer, J. F., & O’Callaghan, J. P. (2012). Chronic exposure to corticosterone enhances the neuroinflammatory and neurotoxic responses to methamphetamine. *Journal of Neurochemistry*, 122, 995–1009.
- Kelly, P. H., & Iversen, S. D. (1976). Selective 6OHDA-induced destruction of mesolimbic dopamine neurons: abolition of psychostimulant-induced locomotor activity in rats. *European Journal of Pharmacology*, 40, 45–56.
- Kish, S. J. (2008). Pharmacologic mechanisms of crystal meth. *CMAJ: Canadian Medical Association journal. Journal de l’Association medicale canadienne*, 178, 1679–1682.
- Kita, T., Shimada, K., Mastunari, Y., Wagner, G. C., Kubo, K., & Nakashima, T. (2000). Methamphetamine-induced striatal dopamine neurotoxicity and cyclooxygenase-2 protein expression in BALB/c mice. *Neuropharmacology*, 39, 399–406.
- Kitamura, O., Takeichi, T., Wang, E. L., Tokunaga, I., Ishigami, A., & Kubo, S. (2010). Microglial and astrocytic changes in the striatum of methamphetamine abusers. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, 12, 57–62.
- Kitanaka, J., Kitanaka, N., Hall, F. S., Uhl, G. R., Asano, H., Chatani, R., & Takemura, M. (2012). Pretreatment with nomifensine or nomifensine analogue 4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline augments methamphetamine-induced stereotypical behavior in mice. *Brain Research*.
- Kiyatkin, E. a, & Sharma, H. S. (2012). Environmental conditions modulate neurotoxic effects of psychomotor stimulant drugs of abuse. *International Review of Neurobiology*, 102, 147–71.
- Kiyatkin, E. A. (2010). Brain temperature homeostasis: physiological fluctuations and pathological shifts. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 15, 73–92.
- Kiyatkin, E. A., & Sharma, H. S. (2009). Acute methamphetamine intoxication brain hyperthermia, blood-brain barrier, brain edema, and morphological cell abnormalities. *International review of Neurobiology*, 88, 65–100.
- Kokoshka, J. M., Vaughan, R. A., Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (1998). Nature of methamphetamine-induced rapid and reversible changes in dopamine transporters. *European Journal of Pharmacology*, 361, 269–275.
- Konsman JP, Vignes S, Mackerlova L, Bristow A, and B. A. (2004). . Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. . *J Comp Neurol*, 472(2004), 113–129.
- Koós, T., & Tepper, J. M. (1999). Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nature Neuroscience*, 2, 467–472.

- Kopin, I. J. (1994). Monoamine oxidase and catecholamine metabolism. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 41, 57–67.
- Kopin IJ. (1985). Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev.*, 37(4), 333–74.
- Korotkova, T. M., Klyuch, B. P., Ponomarenko, a a, Lin, J. S., Haas, H. L., & Sergeeva, O. a. (2007). Modafinil inhibits rat midbrain dopaminergic neurons through D2-like receptors. *Neuropharmacology*, 52(2), 626–33.
- Krasnova, I. N., & Cadet, J. L. (2009). Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain research reviews*, 60, 379–407.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*, 19, 312–318.
- Kuczenski, R., & Segal, D. S. (1999). Sensitization of amphetamine-induced stereotyped behaviors during the acute response. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288, 699–709.
- Kuhn, D. M., Francescutti-Verbeem, D. M., & Thomas, D. M. (2006). Dopamine quinones activate microglia and induce a neurotoxic gene expression profile: relationship to methamphetamine-induced nerve ending damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1074, 31–41.
- Kuhn DM, Angoa-Pérez M, T. D. (2011). Nucleus accumbens invulnerability to methamphetamine neurotoxicity. *ILAR J.*, 52(3), 352–65.
- Kumar, R. (2008). Approved and investigational uses of modafinil: an evidence-based review. *Drugs*, 68, 1803–1839.
- Kumer, S. C., & Vrana, K. E. (1996). Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *Journal of Neurochemistry*, 67, 443–462.
- Kuroda, K. O., Ornthalalai, V. G., Kato, T., & Murphy, N. P. (2010). FosB null mutant mice show enhanced methamphetamine neurotoxicity: potential involvement of FosB in intracellular feedback signaling and astroglial function. *Neuropsychopharmacology: Official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35, 641–655.
- Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., & Bockaert, J. (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, 364, 535–537.
- Lapper, S. R., & Bolam, J. P. (1992). Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neuroscience*, 51, 533–545.
- LaVoie, M J, & Hastings, T. G. (1999). Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19, 1484–1491.
- LaVoie, Matthew J, Card, J. P., & Hastings, T. G. (2004). Microglial activation precedes dopamine terminal pathology in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Experimental Neurology*, 187, 47–57.
- Lazarus, M., Yoshida, K., Coppari, R., Bass, C. E., Mochizuki, T., Lowell, B. B., & Saper, C. B. (2007). EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nature Neuroscience*, 10, 1131–1133.
- Le Moal, M., & Simon, H. (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiological Reviews*, 71, 155–234.
- Lee, S. H., Kang, S. S., Son, H., & Lee, Y. S. (1998). The region of dopamine transporter encompassing the 3rd transmembrane domain is crucial for function. *Biochemical and*

- biophysical research communications*, 246, 347–352.
- Leon, L. R., Gordon, C. J., Helwig, B. G., Rufolo, D. M., & Blaha, M. D. (2010). Thermoregulatory, behavioral, and metabolic responses to heatstroke in a conscious mouse model. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 299, R241–R248.
- Lévesque, M., Bédard, A., Cossette, M., & Parent, A. (2003). Novel aspects of the chemical anatomy of the striatum and its efferent projections. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26, 271–281.
- Lew, R., Vaughan, R., Simantov, R., Wilson, A. & Kuhar, M. J. (1991). Dopamine transporters in the nucleus accumbens and the striatum have different apparent molecular weights. *Synapse*, 8, 152–153.
- Lewis, C., & Dluzen, D. E. (2008). Testosterone enhances dopamine depletion by methamphetamine in male, but not female, mice. *Neuroscience letters*, 448, 130–133.
- Lin, J. S., Roussel, B., Akaoka, H., Fort, P., Debilly, G., & Jouvet, M. (1992). Role of catecholamines in the modafinil and amphetamine induced wakefulness, a comparative pharmacological study in the cat. *Brain Research*, 591, 319–326.
- Lin LY, Di Stefano EW, Schmitz DA, Hsu L, Ellis SW, Lennard MS, Tucker GT, C. A. (1997). Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. *Drug Metab Dispos.*, 25(9), 1059–64.
- Madden, C. J., & Morrison, S. F. (2004). Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamus mediate prostaglandin-evoked thermogenesis in brown adipose tissue. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 286, R320–R325. doi:10.1152/ajpregu.00515.2003
- Makisumi T, Yoshida K, Watanabe T, Tan N, Murakami N, M. A. (1998). Sympatho-adrenal involvement in methamphetamine-induced hyperthermia through skeletal muscle hypermetabolism. *Eur J Pharmacol.*, 362(2-3), 107–12.
- Männistö PT, K. S. (1999). Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev.*, 51(4), 593–628.
- Marek, G. J., Vosmer, G., & Seiden, L. S. (1990). Dopamine uptake inhibitors block long-term neurotoxic effects of methamphetamine upon dopaminergic neurons. *Brain Research*, 513, 274–279-
- Mark, K. A., Soghomonian, J.-J., & Yamamoto, B. K. (2004). High-dose methamphetamine acutely activates the striatonigral pathway to increase striatal glutamate and mediate long-term dopamine toxicity. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24, 11449–11456.
- Matsumura, K., Watanabe, Y., Onoe, H., & Hayaishi, O. (1990). High density of prostaglandin E2 binding sites in the anterior wall of the 3rd ventricle: a possible site of its hyperthermic action. *Brain Research*, 533, 147–151.
- Maxwell, J. C. (2005). Emerging research on methamphetamine. *Current opinion in psychiatry*, 18, 235–242.
- Mayfield, R. D., & Zahniser, N. R. (2001). Dopamine D2 receptor regulation of the dopamine transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes is voltage-independent. *Molecular Pharmacology*, 59, 113–121.
- McGaugh, J., Mancino, M. J., Feldman, Z., Chopra, M. P., Gentry, W. B., Cargile, C., & Oliveto, A. (2009). Open-label pilot study of modafinil for methamphetamine dependence. *Journal of clinical psychopharmacology* (Vol. 29, pp. 488–491).

- McGregor, C., Srisurapanont, M., Mitchell, A., Wickes, W., & White, J. M. (2008). Symptoms and sleep patterns during inpatient treatment of methamphetamine withdrawal: a comparison of mirtazapine and modafinil with treatment as usual. *Journal of substance abuse treatment, 35*, 334–342.
- McKetin, R., Lubman, D. I., Baker, A. L., Dawe, S., & Ali, R. L. (2013). Dose-related psychotic symptoms in chronic methamphetamine users: evidence from a prospective longitudinal study. *JAMA psychiatry, 70*, 319–24.
- Mejía CT., S. A. (1995). *Patrón de consumo de metanfetamina en la población adulta de la frontera noroeste mexicana. México Border Health Association.*
- Même, W., Calvo, C.-F., Froger, N., Ezan, P., Amigou, E., Koulakoff, A., & Giaume, C. (2006). Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 20*, 494–496.
- Mendelson, J. E., McGlothlin, D., Harris, D. S., Foster, E., Everhart, T., Jacob, P., & Jones, R. T. (2008). The clinical pharmacology of intranasal l-methamphetamine. *BMC clinical pharmacology, 8*, 4.
- Mignot E, Nishino S, Guilleminault C, D. W. (1994). Modafinil binds to the dopamine uptake carrier site with low affinity. *Sleep., 17*(5), 436–7.
- Miller, D. B., & O'Callaghan, J. P. (1994). Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 270*, 752–760.
- Minzenberg, M. J., & Carter, C. S. (2008). Modafinil: a review of neurochemical actions and effects on cognition. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 33*(7), 1477–502.
- Mizoguchi, H., Takuma, K., Fukakusa, A., Ito, Y., Nakatani, A., Ibi, D., ... Yamada, K. (2008). Improvement by minocycline of methamphetamine-induced impairment of recognition memory in mice. *Psychopharmacology, 196*, 233–241.
- Moore E. (2011). Methamphetamine: from Pervitin to Desoxyn to Crystal Meth. In *The amphetamine database* (pp. 131–148).
- Moore RY, Bloom F. (1978). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu Rev Neurosci., 1*, 129–69.
- Morgan, J. I., & Curran, T. (1986). Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature, 322*, 552–5.
- Mrzljak, L., Bergson, C., Pappy, M., Huff, R., Levenson, R., & Goldman-Rakic, P. S. (1996). Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature, 381*, 245–248.
- Myrick H, Malcolm R, Taylor B, L. S. (2004a). Modafinil: preclinical, clinical, and post-marketing surveillance--a review of abuse liability issues. *Ann Clin Psychiatry., 16*(2), 101–9.
- Myrick H, Malcolm R, Taylor B, L. S. (2004b). Modafinil: preclinical, clinical, and post-marketing surveillance--a review of abuse liability issues. *Ann Clin Psychiatry., 16*(2), 101–9.
- Nakajima, K., Tohyama, Y., Maeda, S., Kohsaka, S., & Kurihara, T. (2007). Neuronal regulation by which microglia enhance the production of neurotrophic factors for GABAergic, catecholaminergic, and cholinergic neurons. *Neurochemistry international, 50*, 807–820.

- Nakamura, K., Kaneko, T., Yamashita, Y., Hasegawa, H., Katoh, H., & Negishi, M. (2000). Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. *The Journal of comparative neurology*, *421*, 543–569.
- Nakamura, K. (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.
- Nakamura, Kazuhiro, & Morrison, S. F. (2008a). Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. *The Journal of physiology*, *586*, 2611–2620.
- Nakamura, Kazuhiro, & Morrison, S. F. (2008b). A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nature neuroscience*, *11*, 62–71.
- National Research Council (NRC). (2010). *Guide for the care and use of laboratory animals. Laboratory Animals* (Vol. 66, p. 209). Retrieved from <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-Laboratory-animals.pdf>
- Nedergaard, M., Ransom, B., & Goldman, S. A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences*, *26*, 523–530.
- Nestler, E. J., Barrot, M., & Self, D. W. (2001). DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*, 11042–11046.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, *308*, 1314–1318.
- Nordahl, T. E., Salo, R., & Leamon, M. (2003). Neuropsychological effects of chronic methamphetamine use on neurotransmitters and cognition: a review. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, *15*, 317–325.
- Norton, W. T., Aquino, D. A., Hozumi, I., Chiu, F. C., & Brosnan, C. F. (1992). Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochemical research*, *17*, 877–885.
- O'Callaghan, J. P. (1991). Assessment of neurotoxicity: use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomedical and environmental sciences: BES*, *4*, 197–206.
- O'Callaghan, J. P., & Miller, D. B. (1994). Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *270*, 741–751.
- O'Callaghan, JP; Miller, D. (1993). Quantification of Reactive Gliosis as an Approach to Neurotoxicity. *NIDA Research Monograph*, (136), 188–212.
- O'Dell, S. J., Weihmuller, F. B., & Marshall, J. F. (1991). Multiple methamphetamine injections induce marked increases in extracellular striatal dopamine which correlate with subsequent neurotoxicity. *Brain research*, *564*, 256–260.
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H. C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J., Pilcher, W., Ojemann, J., Ransom, B., Goldman, S., Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *29*, 3276–3287.
- Oka, T., Oka, K., Scammell, T. E., Lee, C., Kelly, J. F., Nantel, F., Elmquist, J., Saper, C. B. (2000). Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *The Journal of comparative neurology*, *428*, 20–32.
- Olney, J. W., Labruyere, J., Wang, G., Wozniak, D. F., Price, M. T., & Sesma, M. A. (1991). NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science (New York, N.Y.)*, *254*, 1515–1518.

- Panenka, W. J., Procyshyn, R. M., Lecomte, T., MacEwan, G. W., Flynn, S. W., Honer, W. G., & Barr, A. M. (2013). Methamphetamine use: a comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings. *Drug and alcohol dependence, 129*, 167–79.
- Parent, A., & Hazrati, L. N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain research. Brain research reviews, 20*, 91–127.
- Paxinos, G; Franklin, K. (2001). *The mouse brain stereotaxic coordinates*.
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences, 32*, 421–431.
- Pfrieger, F. W. (2009). Roles of glial cells in synapse development. *Cellular and molecular life sciences: CMLS, 66*, 2037–2047.
- Polesskaya, O., Silva, J., Sanfilippo, C., Desrosiers, T., Sun, A., Shen, J., Feng, C., Polesskiy, A., Deane, R., Zlokovic, B., Kasischke, K., Dewhurst, S. (2011). Methamphetamine causes sustained depression in cerebral blood flow. *Brain research, 1373*, 91–100.
- Porritt, M. J., Batchelor, P. E., Hughes, A. J., Kalnins, R., Donnan, G. A., & Howells, D. W. (2000). New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. *Lancet. 356*, 44-45
- Poth, L. S., O'Connell, B. P., McDermott, J. L., & Dluzen, D. E. (2012). Nomifensine alters sex differences in striatal dopaminergic function. *Synapse (New York, N.Y.), 66*, 686–693.
- Qu, W.-M., Huang, Z.-L., Xu, X.-H., Matsumoto, N., & Urade, Y. (2008). Dopaminergic D1 and D2 receptors are essential for the arousal effect of modafinil. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 28*, 8462–8469.
- Raineri, M., Peskin, V., Goitia, B., Taravini, I. R. E., Giorgeri, S., Urbano, F. J., & Bisagno, V. (2011). Attenuated methamphetamine induced neurotoxicity by modafinil administration in mice. *Synapse (New York, N.Y.), 65*(10), 1087–98.
- Raiteri M, Cerrito F, Cervoni AM, L. G. (1973). Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine. *J Pharmacol Exp Ther., 208*(2), 195–202.
- Ramírez, B. G., Blázquez, C., Gómez del Pulgar, T., Guzmán, M., & de Ceballos, M. L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 25*, 1904–1913.
- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology, 27*, 119–145.
- Rhodes, J. S., Ryabini, A. E., & Crabbe, J. C. (2005). Patterns of brain activation associated with contextual conditioning to methamphetamine in mice. *Behavioral neuroscience, 119*, 759–771. doi:10.1037/0735-7044.119.3.759
- Ricaurte, G. A., Seiden, L. S., & Schuster, C. R. (1984). Further evidence that amphetamines produce long-lasting dopamine neurochemical deficits by destroying dopamine nerve fibers. *Brain research, 303*, 359–364.
- Ridley, R. M. (1994). The psychology of perseverative and stereotyped behaviour. *Progress in Neurobiology.*
- Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2002). Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiology of learning and memory, 78*, 625–636.
- Robertson, P., & Hellriegel, E. T. (2003). Clinical pharmacokinetic profile of modafinil. *Clinical pharmacokinetics, 42*, 123–137.

- Robinson, T E., & Becker, J. B. (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain research*, 396, 157–198.
- Robinson, Terry E., & Berridge, K. C. (2008). Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363, 3137–3146.
- Robson, M. J., Seminerio, M. J., McCurdy, C. R., Coop, A., & Matsumoto, R. R. (2013).  $\sigma$  Receptor antagonist attenuation of methamphetamine-induced neurotoxicity is correlated to body temperature modulation. *Pharmacological reports: PR*, 65, 343–9
- Röhl, C., Armbrust, E., Kolbe, K., Lucius, R., Maser, E., Venz, S., & Gülden, M. (2008). Activated microglia modulate astroglial enzymes involved in oxidative and inflammatory stress and increase the resistance of astrocytes to oxidative stress in vitro. *Glia*, 56, 1114–1126.
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Segev, Y., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G., Schwartz, M. (2008). Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: a role in microglia/macrophage activation. *PLoS medicine*, 5, e171.
- Rummel, C., Sachot, C., Poole, S., & Luheshi, G. N. (2006). Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 291, R1316–R1326.
- Sabol, K. E., Yancey, D. M., Speaker, H. A., & Mitchell, S. L. (2013). Methamphetamine and core temperature in the rat: Ambient temperature, dose, and the effect of a D2 receptor blocker. *Psychopharmacology*.
- Sandoval, V., Riddle, E. L., Hanson, G. R., Fleckenstein, A. E. (2003). Methylphenidate Alters Vesicular Monoamine Transport and Prevents Methamphetamine-Induced Dopaminergic Deficits. *Pharmacology*, 304(3), 1181–1187.
- Scammell, T. E., Elmquist, J. K., Griffin, J. D., & Saper, C. B. (1996). Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 16, 6246–6254.
- Schep, L. J., Slaughter, R. J., & Beasley, D. M. G. (2010). The clinical toxicology of metamfetamine. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 48, 675–694.
- Schepers, R. J. F., Oyler, J. M., Joseph, R. E., Cone, E. J., Moolchan, E. T., & Huestis, M. A. (2003). *Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. Clinical chemistry* (Vol. 49, pp. 121–132).
- Schiltz, J. C., & Sawchenko, P. E. (2002). Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22, 5606–5618.
- Schindler, C. W., Bross, J. G., & Thorndike, E. B. (2002). Gender differences in the behavioral effects of methamphetamine. *European journal of pharmacology*, 442, 231–235.
- Schiørring, E. (1981). Psychopathology induced by “speed drugs”. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 14 Suppl 1, 109–122.
- Schmitt, K. C., & Reith, M. E. A. (2011). The Atypical Stimulant and Nootropic Modafinil Interacts with the Dopamine Transporter in a Different Manner than Classical Cocaine-Like Inhibitors. *PLoS ONE*.
- Schmitz, Y., Lee, C. J., Schmauss, C., Gonon, F., & Sulzer, D. (2001). Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow:



- effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21, 5916–5924
- Seeman, P., Guan, H.-C., & Hirbec, H. (2009). Dopamine D2High receptors stimulated by phencyclidines, lysergic acid diethylamide, salvinorin A, and modafinil. *Synapse (New York, N.Y.)*, 63, 698–704.
- Seiden LS, Woolverton WL, Lorens SA, Williams JE, Corwin RL, Hata N, O. M. (1993). Behavioral consequences of partial monoamine depletion in the CNS after methamphetamine-like drugs: the conflict between pharmacology and toxicology. *NIDA Res Monogr.*, 136(34-46), 46–52.
- Seiden, K.E. Sabol, G. A. R. (1993). Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 33, 639–76.
- Sekine, Y., Ouchi, Y., Sugihara, G., Takei, N., Yoshikawa, E., Nakamura, K., Iwata, Y., Tsuchiya, K., Suda, S., Suzuki, K., Kawai, M., Takebayashi, K., Yamamoto, S., Matsuzaki, H., Ueki, T., Mori, N., Gold, Mark, S., Cadet, J. L. (2008). Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28, 5756–5761.
- Sellings, L. H. L., & Clarke, P. B. S. (2003). Segregation of amphetamine reward and locomotor stimulation between nucleus accumbens medial shell and core. *The Journal of neuroscience* □: *the official journal of the Society for Neuroscience*, 23, 6295–6303.
- Seminario, M. J., Kaushal, N., Shaikh, J., Huber, J. D., Coop, A., & Matsumoto, R. R. (2011). Sigma ( $\sigma$ ) receptor ligand, AC927 (N-phenethylpiperidine oxalate), attenuates methamphetamine-induced hyperthermia and serotonin damage in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 98, 12–20.
- Sharma, H. S., & Kiyatkin, E. A. (2009). Rapid morphological brain abnormalities during acute methamphetamine intoxication in the rat: an experimental study using light and electron microscopy. *Journal of chemical neuroanatomy*, 37, 18–32.
- Shearer J, Darke S, Rodgers C, Slade T, van Beek I, Lewis J, Brady D, McKetin R, Mattick RP, W. A., Shearer, J., Darke, S., Rodgers, C., Slade, T., van Beek, I., Lewis, J., Brady, D., McKetin, R., Mattick, R., Wodak, A. (2009). A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil (200 mg/day) for methamphetamine dependence. *Addiction*, 104(2), 224–33.
- Shechter, R., London, A., Varol, C., Raposo, C., Cusimano, M., Yovel, G., Rolls, A., Mack, M., Pluchino, S., Martino, G., Jung, S., Schwartz, M. (2009). Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS medicine*, 6, e1000113.
- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4, 477–485.
- Shih AY, Fernandes HB, Choi FY, Kozoriz MG, Liu Y, Li P, Cowan CM, K. A. (2006). Policing the police: astrocytes modulate microglial activation. *J Neurosci.*, 26(15), 3887–8.
- Simard, M., & Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, 129, 877–896.
- Simon, P., Hémet, C., Ramassamy, C., & Costentin, J. (1995). Non-amphetaminic mechanism of stimulant locomotor effect of modafinil in mice. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 5, 509–514.
- Smith, A. D., & Bolam, J. P. (1990). The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified

- neurones. *Trends in neurosciences*, 13, 259–265. doi:10.1016/0166-2236(90)90106-K
- Sokoloff, P., Diaz, J., Le Foll, B., Guillin, O., Leriche, L., Bezard, E., & Gross, C. (2006). The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS & neurological disorders drug targets*, 5, 25–43.
- Sriram, K., Miller, D. B., & O'Callaghan, J. P. (2006). Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor-alpha. *Journal of neurochemistry*, 96, 706–718.
- Stephans, S. E., & Yamamoto, B. K. (1994). Methamphetamine-induced neurotoxicity: roles for glutamate and dopamine efflux. *Synapse (New York, N.Y.)*, 17, 203–209.
- Streit, W. J., & Kreutzberg, G. W. (1987). Lectin binding by resting and reactive microglia. *Journal of neurocytology*, 16, 249–260.
- Streit, W. J., Walter, S. A., & Pennell, N. A. (1999). Reactive microgliosis. *Progress in neurobiology*, 57, 563–581.
- Sulzer, D., Chen, T. K., Lau, Y. Y., Kristensen, H., Rayport, S., & Ewing, A. (1995). Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience, 15, 4102–4108.
- Sulzer, David, Sonders, M. S., Poulsen, N. W., & Galli, A. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Progress in neurobiology*, 75, 406–433.
- Swanson LW. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull.*, 9(1-6), 321–53.
- Tanganelli, S., Fuxe, K., Ferraro, L., Janson, A. M., & Bianchi, C. (1992). Inhibitory effects of the psychoactive drug modafinil on gamma-aminobutyric acid outflow from the cerebral cortex of the awake freely moving guinea-pig. Possible involvement of 5-hydroxytryptamine mechanisms. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 345, 461–465.
- Tanibuchi, Y., Shimagami, M., Fukami, G., Sekine, Y., Iyo, M., & Hashimoto, K. (2010). A case of methamphetamine use disorder treated with the antibiotic drug minocycline. *General Hospital Psychiatry*, 32.
- Tashiro, Y., Sugimoto, T., Hattori, T., Uemura, Y., Nagatsu, I., Kikuchi, H., & Mizuno, N. (1989). Tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the striatum of the rat. *Neuroscience letters*, 97, 6–10.
- Tepper, J. M., & Bolam, J. P. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current opinion in neurobiology*, 14, 685–692.
- Thomas, D. M., Francescutti-Verbeem, D. M., & Kuhn, D. M. (2008). The newly synthesized pool of dopamine determines the severity of methamphetamine-induced neurotoxicity. *Journal of neurochemistry*, 105, 605–616.
- Thomas, D. M., & Kuhn, D. M. (2005). Cyclooxygenase-2 is an obligatory factor in methamphetamine-induced neurotoxicity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 313, 870–876.
- Thomas, D. M., Walker, P. D., Benjamins, J. A., Geddes, T. J., & Kuhn, D. M. (2004). Methamphetamine neurotoxicity in dopamine nerve endings of the striatum is associated with microglial activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 311, 1–7.
- Thrash B, Thiruchelvan K, Ahuja M, Suppiramaniam V, D. M. (2009). Methamphetamine-induced neurotoxicity: the road to Parkinson's disease. *Pharmacol Rep.*, 61(6), 966–77.

- Torres, G. E., Gainetdinov, R. R., & Caron, M. G. (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nature reviews. Neuroscience*, *4*, 13–25.
- Truong, J. G., Newman, A. H., Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2004). Dopamine D2 receptor activation increases vesicular dopamine uptake and redistributes vesicular monoamine transporter-2 protein. *European Journal of Pharmacology*, *504*, 27–32.
- Tunbridge, E. M., Harrison, P. J., & Weinberger, D. R. (2006). Catechol-o-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond. *Biological psychiatry*, *60*, 141–151.
- Turner, D. C., Clark, L., Dowson, J., Robbins, T. W., & Sahakian, B. J. (2004). *Modafinil improves cognition and response inhibition in adult attention-deficit/hyperactivity disorder*. *Biological psychiatry* (Vol. 55, pp. 1031–1040). doi:10.1016/j.biopsych.2004.02.008
- Turner, D. C., Clark, L., Pomarol-Clotet, E., McKenna, P., Robbins, T. W., & Sahakian, B. J. (2004). *Modafinil improves cognition and attentional set shifting in patients with chronic schizophrenia*. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* (Vol. 29, pp. 1363–1373).
- Tzschentke, T. M., & Schmidt, W. J. (2003). Glutamatergic mechanisms in addiction. *Molecular psychiatry*, *8*, 373–382.
- U.S. DHHS NIDA. (2013). *Methamphetamine Abuse and Addiction* (pp. 13–4210). Retrieved from [http://www.drugabuse.gov/sites/default/files/methrrs\\_web.pdf](http://www.drugabuse.gov/sites/default/files/methrrs_web.pdf)
- Urbano, F. J., Leznik, E., & Llinás, R. R. (2007). Modafinil enhances thalamocortical activity by increasing neuronal electrotonic coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*, 12554–12559
- Vallone, D., Picetti, R., & Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *24*, 125–132.
- Van Vliet, S. A. M., Blezer, E. L. A., Jongsma, M. J., Vanwersch, R. A. P., Olivier, B., & Philippens, I. H. C. H. M. (2008). Exploring the neuroprotective effects of modafinil in a marmoset Parkinson model with immunohistochemistry, magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Brain research*, *1189*, 219–228.
- Vearrier D, Greenberg MI, Miller SN, Okaneku JT, H. D. (2012). Methamphetamine: history, pathophysiology, adverse health effects, current trends, and hazards associated with the clandestine manufacture of methamphetamine. *Dis Mon.*, *58*(2), 38–89.
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Logan, J., Alexoff, D., Zhu, W., Telang, F., Wang, G., Jayne, M., Hooker, JM., Wong, C., Hubbard, B., Carter, P., Warner, D., King, P., Shea, C., Xu, Y., Muench, L., Aelskog-Torres, K. (2009). Effects of modafinil on dopamine and dopamine transporters in the male human brain: clinical implications. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, *301*, 1148–1154.
- Volz, T J. (2008). Neuropharmacological mechanisms underlying the neuroprotective effects of methylphenidate. *Current neuropharmacology*, *6*, 379–385.
- Volz, Trent J, Fleckenstein, A. E., & Hanson, G. R. (2007). Methamphetamine-induced alterations in monoamine transport: implications for neurotoxicity, neuroprotection and treatment. *Addiction (Abingdon, England)*, *102 Suppl* , 44–48.
- Volz, Trent J, Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2007). The role of the plasmalemmal dopamine and vesicular monoamine transporters in methamphetamine-induced dopaminergic deficits. *Journal of neurochemistry*, *101*, 883–888.

- Von Bernhardi, R., Ramírez, G., Toro, R., & Eugenin, J. (2007). Pro-inflammatory conditions promote neuronal damage mediated by Amyloid Precursor Protein and decrease its phagocytosis and degradation by microglial cells in culture. *Neurobiology of disease*, 26, 153–164.
- Vorspan, F., Warot, D., Consoli, A., Cohen, D., & Mazet, P. (2005). Mania in a boy treated with modafinil for narcolepsy. *The American journal of psychiatry*.
- Wallace, T. L., Gudelsky, G. A., & Vorhees, C. V. (1999). Methamphetamine-induced neurotoxicity alters locomotor activity, stereotypic behavior, and stimulated dopamine release in the rat. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19, 9141–9148.
- Wheeler, R. A., & Carelli, R. M. (2009). Dissecting motivational circuitry to understand substance abuse. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1, 149–159.
- Wichmann, T., & DeLong, M. R. (1998). Models of basal ganglia function and pathophysiology of movement disorders. *Neurosurgery clinics of North America*, 9, 223–236.
- Wilson, J. M., Kalasinsky, K. S., Levey, A. I., Bergeron, C., Reiber, G., Anthony, R. M., Schmunk, G. A., Shannak, K., Haycock, J. W. ... Kish, S. J. (1996). Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users. *Nature medicine*, 2, 699–703.
- Wise, S. P., Murray, E. A., & Gerfen, C. R. (1996). The frontal cortex-basal ganglia system in primates. *Critical reviews in neurobiology*, 10, 317–356.
- Woolverton, W. L., Ricaurte, G. A., Forno, L. S., & Seiden, L. S. (1989). Long-term effects of chronic methamphetamine administration in rhesus monkeys. *Brain research*, 486, 73–78.
- Wu, P., Jones, S., Ryan, C. J., Michail, D., & Robinson, T. D. (2008). Modafinil-induced psychosis. *Internal medicine journal*. 38, 677-8.
- Wu, T.-C., & Grotta, J. C. (2013). Hypothermia for acute ischaemic stroke. *Lancet neurology*, 12, 275–84. Xie, T., McCann, U. D., Kim, S., Yuan, J., & Ricaurte, G. A. (2000). Effect of temperature on dopamine transporter function and intracellular accumulation of methamphetamine: implications for methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20, 7838–7845.
- Yamaguchi, T., Kuraishi, Y., Minami, M., Nakai, S., Hirai, Y., & Satoh, M. (1991). Methamphetamine-induced expression of interleukin-1 beta mRNA in the rat hypothalamus. *Neuroscience letters*, 128, 90–92.
- Yao, W.-D., Spealman, R. D., & Zhang, J. (2008). Dopaminergic signaling in dendritic spines. *Biochemical pharmacology*, 75, 2055–2069.
- Zhang, L., Kitaichi, K., Fujimoto, Y., Nakayama, H., Shimizu, E., Iyo, M., & Hashimoto, K. (2006). Protective effects of minocycline on behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 30, 1381–1393.
- Zolkowska, D., Jain, R., Rothman, R. B., Partilla, J. S., Roth, B. L., Setola, V., Prizinsano T., Baumann, M. H. (2009). Evidence for the involvement of dopamine transporters in behavioral stimulant effects of modafinil. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 329, 738–746.