



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**Participación del sistema dopaminérgico del Núcleo
Accumbens en el proceso de Sensibilización al
Metilfenidato y a la Amfetamina**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Julián Paz Flores

Asesor: Dr. Cruz Reyes Vázquez

Cuautitlan Izcalli, Estado de México 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

U.N.A.M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
SUPERIORES CUAUTITLÁN



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Tesis

Participación del sistema dopaminérgico del Núcleo Accumbens en el proceso de Sensibilización al Metilfenidato y la Anfetamina

Que presenta el pasante: Julián Paz Flores

Con número de cuenta: 303286314 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Noviembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Cruz Reyes Vázquez	
VOCAL	Dr. Francisco López Mejía	
SECRETARIO	M. en C. Lidia Rangel Trujano	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Amparo Ramos Aguilar	
2do. SUPLENTE	M. en C. Taz Nopal Guerrero	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 12°).

HHA/mngm

Agradecimientos

Principalmente le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Con profundo agradecimiento a mi padre por su incondicional apoyo, tanto al inicio como al final de mi carrera; por estar pendiente de mi a cada momento. Porque gracias a él sé que la responsabilidad se la debe vivir como un compromiso de dedicación y esfuerzo.

A mi madre cuyo vivir me ha mostrado que en el camino hacia la meta se necesita de la dulce fortaleza para aceptar las derrotas y del sutil coraje para derribar miedos. Porque si hay alguien que está detrás de todo este trabajo, eres tú, que has sido, eres y serás el pilar de mi vida.

Y a ambos por los valores que me han inculcado, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un excelente ejemplo a seguir.

A mi hermano el incondicional abrazo que motiva y recuerda que detrás de cada detalle existe el suficiente alivio para empezar nuevas búsquedas, además de ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar, por llenar mi vida de alegrías y amor cuando más lo he necesitado. Por su apoyo moral, motivaciones y buen sentido del humor.

A mi abuelo Inocente que aunque ya no se encuentre con nosotros físicamente, siempre estará en mi corazón, a mi abuela Trini por haber creído en mí hasta el último momento. ¡Ya soy QFB!

A mis tíos Tomás, Armando y Nacho, por ser un apoyo moral, gracias por las risas, bromas, palabras de aliento, por su enorme cariño, comprensión y todos los momentos gratos a su lado.

A mis demás familiares, viejos amigos y a quienes recién se sumaron a mi vida para hacerme compañía con sus sonrisas de ánimo.

A la profesora Lidia Rangel, por haber confiado en mi persona y ofrecerme el proyecto, al Dr. Cruz Reyes Vázquez por haber confiado en mi persona, por la paciencia, la atención y el tiempo que han dedicado a enseñarme y formarme como estudiante, por el apoyo durante el desarrollo y la dirección de este trabajo, por los consejos para mejorarlo que he recibido. Gracias por las múltiples revisiones y correcciones a esta tesis.

Por último y no menos importante a mi facultad la FES-Cuautitlan que durante todo este tiempo fue como mi segunda casa, que nunca olvidaré, por haber recibido de ella mi formación profesional, por los excelentes profesores de los que tuve la oportunidad de aprender, por haberme permitido seguir mi vocación científica.

Índice	Pág.
Introducción	6
Psicoestimulantes	7
Cocaína	8
Amfetaminas (AMF)	11
Metilfenidato (MFD)	15
Mecanismos de acción de psicoestimulantes	19
Dopamina (DA)	23
Objetivos	30
Objetivo general	30
Objetivos específicos	30
Hipótesis	30
Materiales y Método	31
Material biológico	31
Material no biológico	31
Preparación de soluciones	32
Metodología de trabajo	33
Resultados	42
Discusión	52
Conclusion	57
Bibliografía	58

Introducción

Los psicoestimulantes (cocaína, amfetamina (AMF) y metilfenidato (MFD)) ejercen sus efectos a través de incrementar los niveles de dopamina (DA) en varias zonas del cerebro, entre ellas el núcleo accumbens. Sus efectos en este sitio generan cambios funcionales que dan origen a la adicción a este tipo de fármacos. Las acciones de la cocaína y la AMF han sido bien estudiados por las repercusiones sociales que ambos poseen. Sin embargo, en el caso del MFD, aunque es un fármaco que se emplea para tratar el trastorno de déficit de atención con hiperactividad, sus efectos en este sitio no se conocen con la debida profundidad. El presente estudio pretende determinar la participación del sistema dopaminérgico del núcleo accumbens en el mecanismo de adicción al MFD. Para ello provocamos la sensibilización de la actividad locomotriz inducida por la aplicación repetida de MFD en ratas preadolescentes. Este fenómeno es el análogo al proceso de adicción en los animales superiores. En varios grupos experimentales modificamos la actividad dopaminérgica del núcleo accumbens por la aplicación de una neurotoxina que destruye a las neuronas catecolaminérgicas, la cual es la 6-hidroxidopamina (6-OHDA). También por la aplicación de un bloqueador no selectivo de receptores dopaminérgicos D₁ y D₂, como es el caso del Haloperidol. Finalmente se aplicó un agonista de receptores dopaminérgicos principalmente del tipo D₁, con poca actividad sobre receptores D₂, como es el caso de la apomorfina. Se registró la actividad locomotriz, empleando un sistema computarizado, durante 60 min antes de la inyección i.p. de Solución salina isotónica (SSI), MFD (2.5mg/kg) ó AMF (2.0 mg/kg) y 60 min después de la inyección. Para inducir la adicción, se aplicó la misma dosis de fármacos durante cada uno de los 3 días continuos a la misma hora. Durante los 3 días siguientes los sujetos no recibieron tratamiento alguno y para el 8avo día los animales son nuevamente sometidos al registro de la actividad locomotriz, y a la aplicación i.p. del fármaco en las mismas condiciones. Previo al registro, un grupo de animales experimentales se sometieron a una intervención quirúrgica para la aplicación en el núcleo accumbens de 6-OHDA. Estos animales fueron posteriormente sometidos al mismo procedimiento experimental que el grupo anterior. Los dos grupos experimentales restantes fueron expuestos previamente al registro experimental, a la implantación de cánulas de acero inoxidable, cuya punta se localizó dentro del núcleo accumbens. A través de estas cánulas se aplicaban 20 µmol, ya sea de haloperidol o de apomorfina, en cada núcleo accumbens, después del registro inicial de la actividad locomotriz en el día 1 y el día 8. Después de la aplicación intracerebral de este fármaco se aplicó el psicoestimulante i.p., con el mismo procedimiento experimental. Los animales tratados con MFD, mostraron un efecto de sensibilización, mientras que los sujetos tratados con AMF mostraron diferentes grados de tolerancia. La aplicación de 6-OHDA modificó sustancialmente ambos efectos. Por otro lado la administración de haloperidol, bloqueó el efecto sensibilizante del MFD, sin un efecto significativo sobre las acciones de la AMF. Por otro lado, la aplicación de apomorfina invirtió los efectos provocados por el MFD y la AMF que se observaron en los animales del grupo control. Estos resultados muestran que los sistemas dopaminérgicos del núcleo accumbens son fundamentales para que el MFD induzca sus efectos sensibilizantes en estos animales. Además el bloqueo de los receptores dopaminérgicos inhibe los efectos inducidos por el MFD pero no tiene efectos sobre las acciones mediadas por la AMF.

Psicoestimulantes

Los psicoestimulantes son fármacos que reducen los umbrales de alerta o de vigilia, de modo que el individuo responde con más facilidad o prontitud a los estímulos ambientales y corporales. Básicamente, los efectos subjetivos de todos los psicoestimulantes dependen de la personalidad del individuo, el medio físico en el cual se administran, la dosis y la vía de administración. Por ejemplo, en una persona no adicta, dosis moderadas de amfetamina (10-20 mg) producen euforia, una sensación de energía y alerta aumentada, anorexia, insomnio y un incremento en las tareas motoras repetitivas. Si la dosis aumenta, este cuadro se intensifica y la influencia del medio ambiente es menos pronunciada¹¹.

Dentro de los psicoestimulantes podemos encontrar las metilxantinas como la cafeína, la teofilina y la teobromina, y también otras sustancias con un perfil y un mecanismo de acción muy diferente como la nicotina, la cocaína, las amfetaminas (AMF) y el Metilfenidato (MFD) (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los psicoestimulantes

Amfetamina y análogos	Alcaloides naturales	Metilxantinas
Dextroamfetamina	Cocaína	Teobromina
Metamfetamina (MDA)	Tropacocaína	Teofilina
Metilenedioximentamfetamina (MDMA)	Nicotina	Cafeína
Fenmetracina		Teína
Fendimetracina		
Metilfenidato (MFD)		
Fentermina		
Pemolina		

Cada una de estas sustancias tiene una farmacocinética y farmacodinamia propias. El mecanismo de acción es específico y la inducción de adicción hacia el fármaco varía notablemente, sobre todo si tomamos en cuenta que uno de los aspectos más interesantes de los psicoestimulantes es su alto grado de adicción. Así, la Organización de las Naciones Unidas

estima la existencia de unos 350 millones de adictos en el mundo, de los cuales 92 millones lo son a los psicoestimulantes. Las metilxantinas son sustancias energizantes con menor riesgo y potencial de abuso¹¹. Tanto la amfetamina como la cocaína y el metilfenidato producen efectos similares sobre el estado de ánimo, provocan toxicidad crónica y poseen un alto potencial de abuso y dependencia. Además, estos fármacos poseen mecanismos de acción muy similares, de los cuales dependen sus efectos terapéuticos por lo que los revisaremos más a detalle.

Cocaína¹⁴

La cocaína es un estimulante extremadamente adictivo que afecta directamente al cerebro, es una de las drogas que se conoce desde hace más tiempo. Las hojas de la coca, de donde se obtiene la cocaína, se han ingerido por miles de años, mientras que la sustancia química pura, el clorhidrato de cocaína, se ha consumido por más de 100 años. A principios del siglo XX, la cocaína purificada se convirtió en el principio activo básico que se empleaba en la mayoría de los tónicos y elixires creados para tratar una gran variedad de enfermedades.

La cocaína pura es extraída de la hoja del arbusto de la coca del género *Erythroxylum*, que crece principalmente en Perú y Bolivia. En la década de los noventa, Colombia se convirtió en el país con mayor cultivo de coca. Hoy en día, la cocaína está incluida en la Lista II de la Ley sobre Sustancias Controladas, lo que implica que tiene un gran potencial para ser abusada, pero que puede ser administrada por un doctor para usos médicos legítimos, por ejemplo, como anestésico local en ciertos tipos de cirugías de los ojos, oídos y garganta.

La cocaína usualmente se vende en la calle en forma de un polvo blanco, fino y cristalino que se conoce en español como “coca”, “nieve”, “dama blanca” o “talco”. Los traficantes generalmente mezclan la cocaína con otras sustancias inertes, tales como la maicena, el talco o el azúcar; o con ciertas drogas activas como la procaína (un fármaco anestésico local de composición química parecida) u otros estimulantes, como las AMFs. Algunos consumidores combinan la cocaína con la heroína en lo que suelen llamar un “*speedball*”.

Hay dos formas químicas de la cocaína que se consumen: la sal clorhidratada (que es

soluble en agua) y los cristales de cocaína o base, conocida en inglés como “*freebase*” (que no son solubles en agua). La sal clorhidratada de cocaína, se consume de forma inyectada o inhalada (“*snorting*”). Los cristales de cocaína se procesan con amoníaco o bicarbonato sódico y agua y luego calentados para eliminar el clorhidrato y producir una sustancia que se puede fumar. El término “*crack*”, es el nombre de la calle que se da a los cristales o base de cocaína, se refiere al sonido crujiente que se oye al fumar esta mezcla. El consumo de cocaína puede ir desde su uso ocasional a un consumo repetido o compulsivo, con una variedad de patrones entre estos dos extremos. Cualquier método de consumo puede causar la absorción de cantidades tóxicas de la droga, con la posibilidad de que ocurra una emergencia aguda de tipo cardiovascular o cerebrovascular y convulsiones, las cuales pueden ocasionar la muerte súbita.

Los efectos de la cocaína se presentan casi inmediatamente después de una sola dosis y desaparecen en cuestión de minutos o dentro de una hora. Los que consumen cocaína en cantidades pequeñas generalmente se sienten eufóricos, energéticos, conversadores y mentalmente alertas, particularmente con relación a las sensaciones visuales, auditivas y del tacto. La cocaína también puede disminuir temporalmente el apetito y la necesidad de dormir. Algunos consumidores sienten que la droga les ayuda a realizar más rápido algunas tareas simples, tanto físicas como intelectuales, mientras que a otros les produce el efecto contrario.

La forma en que se administra la cocaína determina el tiempo que dura el efecto inmediato de euforia. Mientras más rápida es la absorción, más intenso es el “*high*” o euforia; pero al mismo tiempo, cuanto más rápida es la absorción, menor es la duración del efecto de la droga. El “*high*” que se produce al inhalar la droga se demora en llegar pero puede durar de 15 a 30 minutos; En contraste, el “*high*” que se obtiene fumándola puede durar de 5 a 10 minutos.

Los efectos fisiológicos a corto plazo que resultan del consumo de cocaína incluyen contracción de los vasos sanguíneos, dilatación de las pupilas y aumentos en la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca y la presión arterial. Al emplear cantidades mayores se puede intensificar el “*high*” del usuario, pero también puede llevar a un comportamiento más extravagante, errático y violento, además de desasosiego, irritabilidad y ansiedad. También se presentan temblores, vértigos, espasmos musculares y paranoia. Con dosis elevadas existe la

posibilidad de graves complicaciones médicas cardiovasculares como alteraciones en el ritmo cardíaco y ataques al corazón; algunos efectos neurológicos incluyendo ataques cerebrovasculares, convulsiones, dolores de cabeza y hasta coma; y complicaciones gastrointestinales, como dolor abdominal y náusea. En raras ocasiones, puede ocurrir la muerte súbita la primera vez que se prueba la cocaína o de forma inesperada al consumirla subsiguientemente. Las muertes ocasionadas por la cocaína suelen ser el resultado de un paro cardíaco o de convulsiones seguidas por un paro respiratorio. Las investigaciones también han demostrado que existe una interacción potencialmente peligrosa entre la cocaína y el alcohol.

Ya que la cocaína es una droga extremadamente adictiva, es muy difícil que una persona que la pruebe pueda predecir o controlar hasta dónde continuará deseándola o consumiéndola; además, si la persona se vuelve adicta, el riesgo de recaídas es alto después de periodos largos de abstinencia. De acuerdo con algunos estudios recientes, durante periodos de abstinencia del uso de cocaína, el recuerdo de la euforia asociado con su uso, o solamente una referencia a la droga, puede disparar un deseo incontrolable de consumirla y terminar en una recaída.

Al ser expuesto repetidamente a la cocaína, el cerebro comienza a adaptarse a la misma y la vía de gratificación se vuelve menos sensible a los refuerzos naturales y a la droga en sí. El consumidor puede desarrollar tolerancia, lo que significa que necesitará una dosis cada vez mayor de la droga o que deberá consumirla con más frecuencia para obtener el mismo placer que cuando recién comenzó a usarla. Al mismo tiempo, los consumidores también se pueden volver más sensibles (sensibilización) a la ansiedad, las convulsiones u otros efectos tóxicos de la cocaína^{14, 37,52}.

El uso agudo de cocaína produce una serie de modificaciones moleculares que trasladan al sujeto de una condición de uso específico, a un estado de dependencia. Se han sugerido diferentes suposiciones aclaratorias de este fenómeno como la alostasis neuroquímica, la sensibilización del incentivo, las desregulaciones de la homeostasis y teorías basadas en el condicionamiento clásico y operante^{37,52}. Además, se ha podido comprobar la implicación de diferentes moléculas y vías de señalización intracelular, que generan, en última instancia, una serie de modificaciones plásticas a largo plazo, factiblemente indelebles, que se podrían

relacionar con la vulnerabilidad a las recaídas, y la persistencia de la adicción a la cocaína, incluso años después de dejar el consumo^{13,37,52}.

En la actualidad no hay un medicamento que sirva para tratar la adicción a la cocaína. Varios fármacos comercializados para el tratamiento de otras enfermedades (por ejemplo, baclofeno, modafinilo, tiagabina, disulfiram y topiramato) muestran cierto potencial terapéutico y, en estudios clínicos controlados, se ha reportado que disminuyen el consumo de cocaína. Por otra parte, los nuevos conocimientos sobre cómo cambia el cerebro cuando se consume cocaína están dirigiendo la atención hacia nuevos objetivos para el desarrollo de medicamentos con estas propiedades^{13,14,37}.

Amfetamina⁵²

La AMF es una alfa-metil-fenil-etil-amina (fig. 1), es un agente adrenérgico sintético estimulante potente del sistema nervioso central. Se trata de una molécula quiral, cuya configuración óptica puede presentarse en forma de enantiómeros activos dextrógiros y levógiros. La amfetamina o amfetamina racémica (d, l-amfetamina) es una mezcla equimolar de ambos isómeros ópticos. La *dexamfetamina* (dextro-amfetamina) y la *levo-amfetamina*, surgen de la separación del compuesto en sus dos configuraciones ópticas posibles. La *levo-amfetamina* tiene débil injerencia en los efectos clínicos de la amfetamina. La *dexamfetamina* (isómero óptico dextrógiro de la molécula) es responsable casi plenamente de la actividad farmacológica del compuesto.

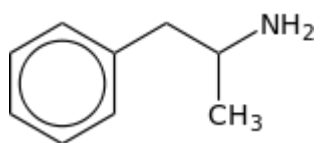


Fig. 1 molécula de amfetamina.

La expresión AMFs (forma plural de la anterior) tiene dos acepciones posibles. La más restringida, se usa para referir a la tríada formada por la AMF, dexamfetamina y metanfetamina, mientras que la más general alude también a los *estimulantes de tipo amfetamínico* (ETA). Los ETA son la familia farmacológica integrada por compuestos con

estructura química análoga o derivada de la molécula de AMF, con propiedades clínicas similares, y con un grado de actividad farmacológica (potencia) comparable. Se incluye también en el grupo a las sustancias amfetamínicas a *estimulantes* como el MFD (análogo estructural) y el dex-metilfenidato; y a derivados químicos con propiedades *entactógenas* (genera sentimientos de empatía), como el MDMA; y *anorexígenos*, como el Fenproporex, el dietilpropion (amfepramona), la Fentermina, la benzfetamina, la fendimetrazina, siendo estas últimas las de menor potencia relativa.

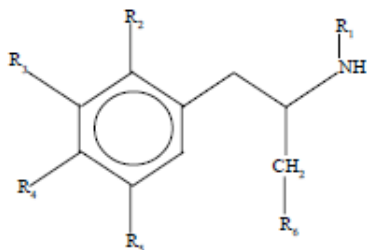
La AMF es un derivado de la efedrina, sintetizado en 1887 por L. Edeleano, quien llamó al compuesto *fenilisopropilamina*. El uso médico experimental de las AMFs comenzó en los años veinte. La habilidad de la AMF para elevar la presión sanguínea, contraer los vasos sanguíneos, y dilatar los pequeños sacos bronquiales, dio lugar a su comercialización, presentándose el inhalador *Benzedrina*. Poco tiempo después, apareció la dexamfetamina (*Dexedrina*). En 1938 se lanzó al mercado la metanfetamina (*Methedrina*) y, en 1954 el MFD (*Ritalin*). Un reporte farmacéutico de 1946, listaba 39 desórdenes para los cuales la AMF era el tratamiento recomendado para enfermedades como la narcolepsia, la obesidad, la depresión, el síndrome de trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) en niños y adultos, el tratamiento de sobredosis por sedantes, e incluso la rehabilitación del alcoholismo y hábito de otras drogas.

La AMF es utilizada como agente para mejorar el rendimiento, tanto físico (*doping deportivo*), como intelectual (*doping cognitivo*). La prescripción indiscriminada del producto, desencadenó fenómenos de abuso y adicción. Actualmente es una sustancia controlada sujeta a fiscalización, pero accesible en la mayoría de los países, cuyas principales indicaciones son el TDAH en niños (desde 3 años en adelante) y en adultos; y la narcolepsia. También tiene indicación en el tratamiento de la obesidad (opción de segunda línea), y en la depresión refractaria (resistente a los tratamientos convencionales).

La molécula de la AMF está emparentada estructuralmente con el alcaloide vegetal efedrina (Tabla 2). Fue precisamente la efedrina, el sustrato usado inicialmente como reactivo para la obtención del nuevo compuesto. Como la efedrina, la AMF es también un agente con

propiedades simpaticomiméticas que activa al sistema nervioso simpático; además de que atraviesa eficazmente la barrera hematoencefálica, lo que explica su capacidad distintiva de estimular el sistema nervioso central. Esto último habilita su clasificación como amina simpaticomimética de acción central.

Tabla 2. Amfetamina y derivados



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
<i>Anorexígenas</i>						
ANFETAMINA	H	H	H	H	H	H
FENFLURAMINA	C ₂ H ₅	H	H	H	CF ₃	H
FENPROPorex		H	H	H	H	H
ANFEPRAMONA (fenilisopropanonaamina)	(C ₂ H ₅) ₂	H	H	H	H	H
CLOBENZorex		H	H	H	H	H
<i>Entactógenas</i>						
METANFETAMINA	CH ₃	H	H	H	H	H
MDMA (Éxtasis)	CH ₃	H			H	H
MDA (Eva)	H	H			H	H
MDEA (Adán)	CH ₂ CH ₃	H			H	H
MBDB	CH ₃	H			H	CH ₃
<i>Alucinógenas</i>						
DOM	H	OCH ₃	H	CH ₃	OCH ₃	H
DOI	H	OCH ₃	H	I	OCH ₃	H
STP	H	OCH ₃	H	CH ₂ CH ₃	OCH ₃	H
PMA	H	H	H	OCH ₃	H	H

En la actualidad, la presentación más popular consiste en un preparado a base de sales mixtas de AMF y dextroamfetamina, conocido por la marca *Adderall*, la cual se administra por vía oral y tiene una buena absorción, de modo que el inicio de la acción terapéutica se manifiesta al cabo de unos 30 a 60 minutos. La semivida de eliminación es de unas 10 horas.⁵² Todas las AMFs son agonistas indirectas de los receptores pre-sinápticos para noradrenalina (NA) y DA a nivel del sistema nervioso central. La AMF se une a estos receptores y los activa, induciendo la liberación de los neurotransmisores de reserva alojados en las vesículas de las terminales nerviosas, convirtiendo los respectivos transportadores moleculares en canales abiertos. También tiene una acción agonista serotoninérgica, aunque relativamente más débil.

La AMF estimula el sistema nervioso central mejorando el estado de vigilia y aumentando los niveles de alerta y la capacidad de concentración. Favorece las funciones cognitivas superiores, como la atención y la memoria (en particular, la memoria de trabajo) y muestra sus efectos sobre las funciones ejecutivas. Produce efectos *reforzadores*, asociando a determinadas conductas con emociones placenteras (gratificación). A nivel conductual, refuerza los sistemas implicados en la regulación de las respuestas a emociones específicas; reduce los niveles de impulsividad (autocontrol). En el caso particular de la obesidad, se la ha utilizado debido a su acción sobre los centros hipotalámicos que regulan el apetito. Por último, es un agente activante del sistema nervioso simpático, con efectos adrenérgicos periféricos, que se traducen en un aumento en el nivel de actividad locomotriz, en la resistencia a la fatiga, en la actividad cardio-respiratoria, y en particular, en los procesos metabólicos termogénicos del organismo, dando lugar a una mayor oxidación de las reservas grasas.

Como droga recreativa, la AMF, es más conocida popularmente como *speed* o *amfeta*, es utilizada para pasar largas noches sin dormir, apareciendo en forma de polvo, fácilmente obtenible, que es inhalado. Los efectos van desde euforia, vista borrosa y energía no habitual a sudoración, vómitos y ataques de ansiedad. Los consumidores pueden pasar varios días consecutivos sin dormir, con el consecuente cansancio psíquico que lleva a veces a crisis de paranoia y ansiedad. La AMF produce un síndrome denominado psicosis amfetamínica, parecido a la psicosis cocaínica o a la esquizofrenia paranoide.

El Metilfenidato.

El Metilfenidato (MFD) ó metilfenidán es un polvo cristalino fino, blanco, inodoro preparado por síntesis química. La molécula de MFD posee dos centros de quiralidad; por lo tanto, existe un total de cuatro enantiómeros de esta droga. Las primeras formulaciones de MFD que se comercializaron contenían los cuatro enantiómeros. Estudios subsecuentes revelaron, sin embargo, que los isómeros eritro estaban desprovistos de efectos estimulantes significativos sobre el sistema nervioso central. A causa de esto, las formulaciones actualmente disponibles contienen una mezcla racémica de solo d,l-treo-metilfenidato. Como se verá más adelante, la actividad farmacológica se atribuye principalmente al isómero d-treo.⁵

El MFD es una amina simpaticomimética, cuya fórmula molecular es $C_{14}H_{19}NO_2$. Pertenece al grupo de las fenetilaminas y, en particular, es un análogo ciclizado de la AMF. Estructuralmente, el MFD añade al modelo un anillo piperidínico, que incluye al nitrógeno y al carbono beta (Fig. 2). El clorhidrato de MFD (sal utilizada en la forma farmacéutica) es el clorhidrato de metil- α -fenil-2-piperidinacetato y contiene aproximadamente un 87% de MFD base. El peso molecular de aquel es 269.77 g/mol.

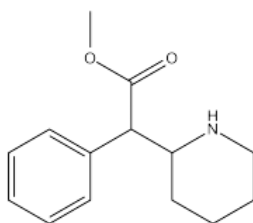


Fig. 2 Molécula del MFD

El MFD, es un medicamento psicoestimulante que se emplea en el tratamiento de trastorno por déficit de atención con hiperactividad, síndrome de taquicardia ortostática postural y en la narcolepsia. También podría ser prescrito para casos resistentes a tratamientos de fatiga y depresión. El MFD posee similitudes estructurales a la AMF, pero sus efectos farmacológicos son más similares a los de la cocaína, aunque los efectos del MFD son menos potentes y de menor duración. Además, el MFD posee potentes efectos agonistas sobre receptores alfa y beta adrenérgicos, lo cual eleva el nivel de alerta (*arousal*) del sistema nervioso central, lo que es mensurable electrofisiológicamente (por la presencia de ondas de bajo voltaje en el EEG).

Incrementa los mecanismos excitadores del cerebro en forma selectiva, esto resulta en una mejor concentración, coordinación motora y control de los impulsos^{5,21}.

El MFD existe desde hace ya más de 60 años. Sin embargo, cobró especial notoriedad a partir de los años noventa. Esto se debió a la difusión del diagnóstico de trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) en niños y adultos. Tanto el diagnóstico como el fármaco han sido objetados, apelando incluso a principios éticos, ideológicos o religiosos⁵.

Las críticas al TDAH y al MFD devienen, a menudo, de un rechazo al concepto general de disfunción neurobiológica y a los supuestos neuroquímicos que subyacen a las prácticas de la psiquiatría contemporánea. En 1998, un panel de expertos redactó un consenso procurando legitimar la entidad clínica de este trastorno y la necesidad de tratar el mismo. Hallazgos recientes en neurociencias, por ejemplo los provistos por neuroimágenes, parecen ratificar el origen orgánico del síndrome, habiéndose identificado patrones específicos de expresión fisiológica. Por último, estudios en materia de herencia biológica han revelado una fuerte asociación de éste con determinados genes. El MFD es la medicación más comúnmente prescrita para tratar el TDAH en todo el mundo. De acuerdo a estimaciones, más del 75% de las recetas de MFD son extendidas a niños, siendo aquel trastorno unas cuatro veces más frecuente entre los varones que entre las niñas²¹.

Los efectos del MFD en el TDAH se atribuyen a una mejora en la capacidad inhibitoria de los circuitos frontosubcorticales mediados por el neurotransmisor dopamina (DA). En particular, incrementa la acción reguladora de la corteza frontal y estructuras inferiores a nivel del cerebro anterior basal, como el núcleo estriado ventral. Hacia la porción ventral de este último, localizado en los ganglios basales de las áreas prefrontales del cerebro, se encuentra el *núcleo accumbens*. La DA actúa en el núcleo accumbens limitando la información que debe ser procesada, permitiendo focalizar la atención. En el TDAH, la corteza prefrontal no modularía adecuadamente a una estructura pontina llamada *locus coeruleus*, lo que provoca un déficit de DA y noradrenalina. Esta falta de inhibición se manifiesta en un ingreso excesivo de información. Así, surgen dificultades para seleccionar estímulos pertinentes, y aumenta la distracción. La serotonina también podría estar implicada, pues se relaciona con el control de

los impulsos.

En estudios realizados con PET (tomografía por emisión de positrones) en adultos con TDAH, se encontró una disminución del 8,1% en el metabolismo cerebral de la glucosa en relación a los controles, sobre todo a nivel de la corteza prefrontal y áreas premotoras⁴⁵. Estudios recientes del flujo cerebral muestran que, durante el tratamiento con MFD, se incrementan tanto la actividad en el estriado como las conexiones entre la región órbita-frontal y límbica.

En los niños con trastornos por déficit de la atención, el MFD disminuye las conductas impulsivas y la inquietud motora, y aumenta la actividad cognitiva (atención, memoria), mejorando su capacidad de concentrarse en tareas repetitivas, que demandan esfuerzo mental sostenido y no se asocian a una satisfacción inmediata. En los adultos con TDAH, el MFD favorece las funciones ejecutivas, relacionadas con el control cognitivo. Éstas incluyen un conjunto de funciones cerebrales que involucra: autorregulación, secuencia y organización del comportamiento, flexibilidad, inhibición de respuestas y planificación¹⁷.

En la vida cotidiana de estos adultos, suelen manifestarse avances significativos en la capacidad de focalizarse en el trabajo y administrar el tiempo (organización), disponer de sus recursos con metas a mediano y largo plazo (planificación), lograr continuidad en sus proyectos (secuencia), e interaccionar más adecuadamente con el entorno (flexibilidad). Estos cambios en el desempeño, afectan contextos vitales para el sujeto, como son las áreas familiar, académica y laboral¹⁷.

La acción del MFD sobre el sistema nervioso central, resulta particularmente eficaz en la terapéutica del TDAH, en la medida en que hace blanco en déficits neuroquímicos comunes a las personas con este trastorno. Sin embargo, individuos que no tienen TDAH pueden obtener de la droga efectos reforzadores, vinculados con alteraciones del humor, la percepción, el pensamiento y sensaciones de tipo euforizante. En estos casos, en que hay desvío terapéutico de la droga, el MFD se puede asociar a conductas adictivas⁶⁰.

Los abusadores de droga experimentados no distinguen los efectos de la cocaína con los del MFD. Recientemente, se realizó un estudio comparando los mecanismos de acción de

ambos compuestos¹. Los dos ejercen sus efectos inhibiendo la recaptura de la DA. El incremento en los niveles extracelulares de este neurotransmisor, en el eje mesolímbico-cortical del cerebro, activa una vía neuronal vinculada con la recompensa. A dosis terapéuticas, el MFD bloqueó el 78,5% de las moléculas transportadoras de DA, por encima de la tasa registrada para la cocaína. Se concluyó: "La evidencia claramente muestra que la noción de que el Ritalin es un estimulante poco potente es completamente incorrecta". Sin embargo, ese mismo estudio reveló que el potencial de abuso de la cocaína se explica mejor por el hecho de que esta droga, al ser inhalada, se liga a los receptores con gran rapidez, actuando en apenas segundos, lo que se asocia a una inducción drástica y súbita de los efectos psicotrópicos. El MFD, en cambio, se une a esos mismos receptores con mayor potencia pero de manera gradual y progresiva, produciendo cambios paulatinos. Por otra parte, la cocaína abandona el sistema unas 6 a 8 veces más rápidamente que el MFD, lo que se vincula con síndromes carenciales¹.

Los efectos reforzadores en los casos de abuso de estimulantes, se asocian con mejoría del ánimo, sensación de aumento de la energía física, de la capacidad mental y del estado de alerta, supresión del apetito de la fatiga y del sueño, aumento de atención/enfoque, locuacidad y euforia⁵⁴. Los adictos pulverizan los comprimidos para poder inhalar el contenido. Algunos los disuelven en agua, inyectándose la mezcla por vía intravenosa, lo que puede ocasionar complicaciones adicionales debido a que algunos excipientes insolubles presentes en los comprimidos podrían obstruir los vasos sanguíneos más estrechos¹.

La adicción a los estimulantes parece ocurrir cuando se producen aumentos considerables y bruscos de los niveles de DA extracelular en el cerebro, y éstos se vinculan con la vías de administración intravenosa e intranasal. En estos casos, cuando hay abuso, el MFD sería también más potente que la AMF. El efecto terapéutico, por el contrario, se logra con incrementos graduales y progresivos de DA, similares a la producción natural del cerebro, como los que produce el MFD si se lo administra por vía oral. De esta manera, el riesgo de adicción es relativamente bajo.

Mecanismos de acción de psicoestimulantes

Los resultados de varias investigaciones han permitido esclarecer el mecanismo que utilizan los psicoestimulantes para producir sus efectos placenteros y la razón por la cual son tan adictivos. Se ha descrito la presencia de ciertas regiones del cerebro que se excitan por todo tipo de estímulos gratificantes, tales como la comida, el sexo y muchas de las drogas de abuso.

El sistema neuronal que parece ser más afectado por los psicoestimulantes se origina en una región del cerebro medio llamada el área ventral tegmental (AVT), cuyas eferencias se extienden a la región del cerebro conocida como núcleo accumbens, una de las áreas clave del sistema límbico involucradas en la gratificación. Los estudios en animales han demostrado que la gratificación es consecuencia del incremento de DA, en el núcleo accumbens. En el proceso normal de comunicación, una neurona, llamada presináptica, libera DA en la hendidura sináptica (el sitio a través del cual dos neuronas se comunican entre ellas). Allí la DA se une a proteínas especializadas (llamadas receptores a la DA) en la neurona postsináptica, enviando así una señal a la misma. Una vez enviada la señal, la DA es eliminada de la sinapsis a través de su degradación o su recaptura por la membrana presináptica y es reciclada para volver a usarse en el futuro. Las drogas de abuso pueden interferir con este proceso de comunicación normal. Por ejemplo, estudios muestran que los psicoestimulantes actúan bloqueando la eliminación de la DA de la sinapsis, lo que resulta en una acumulación de DA y una amplificación de la señal a las neuronas post-sinápticas. Tal efecto causa la euforia inicial que suelen reportar los adictos. El nivel de potencia de la AMF para bloquear estas moléculas transportadoras es menor a la del MFD y a la de la cocaína²⁵.

Estos efectos combinados rápidamente aumentan las concentraciones de los respectivos neurotransmisores en el espacio sináptico, promoviendo la transmisión del impulso nervioso en las redes neuronales dopaminérgicas y noradrenérgicas.

Los psicoestimulantes presentan un fenómeno único conocido como sensibilización, este fenómeno que se presenta con todos los psicoestimulantes, en gran parte es debido a la hiperfunción dopaminérgica cortico-límbica, un ejemplo de este fenómeno es el incremento de

la conducta motora estereotipada que se observa en abusadores de AMFs, así como la progresiva aparición de alteraciones de la personalidad y síntomas psicóticos tras el consumo crónico de cocaína o AMF¹. Los primeros cambios que aparecen son de tipo ansioso y/o depresivo, con confusión, agresividad y pérdida de interés por la mayoría de las actividades. Se pueden producir psicosis tóxicas, con alucinaciones visuales y táctiles e ilusiones paranoides.

Para el tratamiento puede recurrirse a fármacos antipsicóticos. El proceso de sensibilización se está estudiando experimentalmente de modo intensivo en el ámbito bioquímico y conductual, pues se considera en la actualidad que representa la expresión de cambios plásticos cerebrales debidos al consumo crónico de droga y subyace al incremento del valor motivacional de la droga (efecto incentivo), así como a los fenómenos de abstinencia y recaída una vez que se abandona la droga, este fenómeno que se estudia en animales inferiores, sería el equivalente al proceso de adicción en los humanos^{4, 38, 48,49}.

Otro fenómeno que se presenta con los psicoestimulantes es la tolerancia, la cual constituye la disminución progresiva de efectos de la droga. La mayoría de los usuarios requieren dosis crecientes para producir los mismos efectos subjetivos experimentados al iniciar la ingesta, pues se desarrolla tolerancia a algunos de los efectos centrales, como la euforia y la anorexia. La tolerancia se debe probablemente a una excreción aumentada de la droga, aunque han de intervenir fenómenos neuroquímicos adaptativos en el sistema nervioso. Existe tolerancia cruzada entre los diferentes psicoestimulantes.

Como se mencionó, la adicción a psicoestimulantes se fundamenta en un fenómeno de sensibilización con dos fases: inducción y expresión. La exposición repetida a psicoestimulantes induce un aumento progresivo de la actividad motora en numerosas especies, incluido el ser humano. Este fenómeno se denomina ‘sensibilización conductual’, y se asocia a cambios plásticos en circuitos nerviosos que, por otra parte, incrementan el valor motivacional de las drogas y además subyacen al fenómeno del deseo de ingerir la droga (*craving*) una vez que se abandona el consumo^{4, 38, 48,49}. Estos cambios plásticos neuronales son motivo de intenso estudio. Tanto la inducción, como la expresión, constan de mecanismos neuroquímicos y moleculares diferentes¹¹.

En la inducción participa de modo crítico el circuito mesocortico-límbico, y en ella se establecen cambios bioquímicos que fundamentan la sensibilización y facilitan el aprendizaje adictivo. En la expresión, destaca el sistema corticoestriatoamigdalino, y en esta fase se desarrollan los cambios bioquímicos que generan el hábito adictivo, como conducta patológica consolidada. Además, se consolida la sensibilización y también aparecen fenómenos de tolerancia. Sin embargo, el proceso sensibilizador es más complejo que el simple cambio en una vía de neurotransmisión, y los resultados de cientos de experimentos indican que la sensibilización se debe a la interacción de diversos neurotransmisores, neuropéptidos, factores neurotróficos, sus receptores y sus vías de señalización intracelular¹¹.

La fase de inducción de la sensibilización está mediada por cambios en la transmisión de DA y otro neurotransmisor, el glutamato en el área ventral tegmental. La administración de cocaína y AMF induce un incremento de los niveles de DA en el ATV, y la administración repetida incrementa aún más la actividad dopaminérgica en esta región⁴⁰. El incremento inicial transitorio en la liberación de DA puede provocar una desensibilización de los autoreceptores D2 de las neuronas de DA, que induce despolarización y excitación celular por cierre de canales de potasio. De hecho, la administración del agonista D2 quimpirol incrementa el efecto de la cocaína, pues facilita la desensibilización de estos receptores, y si se bloquea la despolarización mediante baclofeno (agonista GABAérgico), se anula la sensibilización^{16, 39}.

Se describió la existencia de un efecto transitorio con aumento de la actividad de glutamato en el AVT, con aumento de las corrientes entrantes a través de receptores AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) de glutamato en las neuronas de DA (esto, a su vez, despolariza las células y mantiene la excitación neuronal). Inicialmente se sugirió que la actividad glutamatérgica aumentada procedía de las terminales de la corteza prefrontal, pues la lesión de ésta anula la inducción de la sensibilización. El incremento en la actividad de DA en el AVT tras psicoestimulantes, facilitada por despolarización neuronal, estimula receptores D₁ pre-sinápticos que ocasionan una mayor liberación local de glutamato, lo que a su vez estimula aún más las neuronas de DA del ATV, constituyendo estos hechos un ciclo fundamental en la inducción de la sensibilización a psicoestimulante^{42,58,59,64}.

Los receptores ionotrópicos de glutamato NMDA (n-metil-d-aspartato) y AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) y los canales de calcio del tipo L de las neuronas dopaminérgicas del AVT desempeñan un papel decisivo en la sensibilización. La mayor liberación de glutamato mediada por receptores pre-sinápticos D1 de DA regula al alza los canales de calcio tipo L en las neuronas de DA del AVT. Además, la despolarización de las neuronas de DA antes comentada origina la apertura de canales NMDA, que normalmente están inactivos, contribuyendo en conjunto a una mayor entrada de calcio. El calcio actúa como una molécula ‘gatillo’ y su entrada induce una activación de vías intracelulares dependientes de este ión, por ejemplo, uniéndose a calmodulina, que regula la fosforilación y activación de diversas enzimas, como la proteincinasa C (PKC) o las calmodulina cinasas I, II y IV (CaMK I, II y IV). Entre éstas destaca la CaMK II, que permanece fosforilada (activa) largo tiempo, incluso tras la ausencia de calmodulina unida a calcio. Una vez activada, la CaMK II puede fosforilar a su vez canales AMPA, receptores NMDA, canales de calcio tipo L, la enzima tirosinhidroxilasa –sintetizadora de DA– y sinapsina I, que facilita el almacenamiento vesicular de DA. Es evidente que todos estos fenómenos amplifican el proceso de sensibilización mediado por calcio. De hecho, la administración intra-AVT de un inhibidor de la CaMK II, el KN-93, bloquea el desarrollo de sensibilización a cocaína²⁹.

Un blanco común de las vías CaM y MAP cinasas, estimuladas por los psicoestimulantes, es el factor de transcripción CREB, involucrado en procesos de plasticidad neuronal. Se sabe que una sola inyección de AMF en el AVT induce un incremento de los niveles de CREB⁸. Las enzimas CaM activan CREB fosforilándola en el residuo 133 de serina. Blancos de CREB son, por ejemplo, las proteínas de la familia Fos y la neurotensina, que se expresan en el ATV⁵⁷. El aumento de CREB en el AVT y núcleo accumbens se ha postulado como un mecanismo de neuroadaptación, pues disminuye las propiedades reforzadoras de los psicoestimulantes.³⁸ Sin embargo, también participa en cambios proteicos y enzimáticos a largo plazo que subyacen a la adicción. Así el aumento de CREB activa la enzima tirosinhidroxilasa, lo que explica que la síntesis de DA aumenta en el AVT y sus terminales durante el desarrollo de la sensibilización, y fosforila la sinapsina I, lo que induce un mayor almacenamiento de DA en las vesículas de secreción¹⁰. Otros factores de transcripción aumentados son los de la familia Fos (a través de CREB u otras vías de cinasas como PKC), que se unen a miembros de la familia de señaladores

intracelulares tipo Jun para formar proteínas activadoras-1 (AP-1), que regulan la expresión genética.

Entre estos factores destaca c-Fos, Fras-1, Fras-2 y δ FosB. Todos aumentan de modo transitorio tras el consumo de droga, excepto δ FosB que se va acumulando en el citoplasma, razón por la cual es un serio candidato para explicar cambios a largo plazo en el proceso adictivo. Experimentalmente se ha demostrado que este factor es crítico en el desarrollo de la sensibilización³⁸. Finalmente, hay otros factores de transcripción involucrados, como son el Egr1-3 y el Nac-1, que aumentan en el núcleo *accumbens* durante la sensibilización a cocaína³⁶. Estos resultados muestran que el punto clave en los procesos de sensibilización y adicción a los psicoestimulantes lo constituye los procesos dopaminérgicos meso-límbicos y meso-corticales, por lo cual el conocimiento y análisis de estos procesos es fundamental para determinar los mecanismos de acción precisos que cada uno de los fármacos psicoestimulantes utiliza para ejercer su acción.

Dopamina

La Dopamina (DA) (Fig. 3) es la catecolamina más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos (representa el 80% del contenido total de catecolaminas del cerebro) y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, el aprendizaje, la memoria, la motivación, la emotividad y la afectividad así como en la comunicación neuroendócrina. Como otros neurotransmisores, la DA no cruza la barrera hematoencefálica, pero sí sus precursores, la fenilalanina, la tirosina y la L-dopa. La liberación de DA en la hendidura sináptica se debe a la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje, el cual promueve la fusión de vesículas con la membrana pre-sináptica, dando lugar a la exocitosis de la DA, de forma que ésta difunde a través de la hendidura sináptica hasta unirse a sus receptores tanto pre- como post- sinápticos¹⁰.

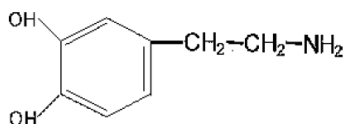


Fig. 3.- estructura química de la DA (3,4-dihidroxifeniletilamina)

La señal dopaminérgica finaliza con la eliminación de la DA del espacio inter-sináptico, implicando mecanismos de recaptura específicos en el terminal pre-sináptico donde se vuelve a almacenar o es metabolizada. Aunque existen enzimas extra-neuronales que catabolizan la DA liberada, la terminación del efecto se debe principalmente a la recaptura del neurotransmisor por las propias terminales nerviosas que la liberaron. Esto tiene lugar mediante transportadores específicos que juegan un papel esencial en la función, inactivación y reciclaje de la DA liberada¹⁰.

Los efectos fisiológicos de la DA, al igual que la de todos los neurotransmisores, son resultado de la interacción de la molécula con su receptor específico, los receptores para DA pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G. Las técnicas de clonación molecular han permitido la identificación de 5 tipos de receptores dopaminérgicos, todos ellos acoplados a proteínas G, mismos que se clasifican en dos subfamilias en función de sus propiedades bioquímicas y farmacológicas: D₁ y D₂. Los receptores de la familia D₁ (comprende los subtipos D₁ y D₅) están acoplados a proteínas G_s y estimulan la formación de AMPc como principal mecanismo de transducción de señales, y se localizan principalmente en las terminales post-sinápticas¹⁰.

En cambio los subtipos pertenecientes a la familia D₂ (que comprende a los receptores D₂, D₃ y D₄) inhiben la formación de AMPc, activan canales de K⁺ y reducen la entrada de iones de Ca²⁺ a través de canales dependientes del voltaje, efectos mediados también por proteínas G_i, éstos pueden localizarse en terminales tanto pre-sinápticas como post-sinápticas.

La diferencia de afinidad que presentan los receptores de DA por su ligando endógeno puede permitir la activación de unos receptores u otros en función de la cantidad de DA liberada. Teniendo en cuenta los diferentes mecanismos de transducción de señal de cada subtipo de receptor, se puede generar una gran variedad de respuestas a una misma sustancia. Esta diversidad dentro de los receptores de DA es un reflejo de la diversidad funcional que ejerce este neurotransmisor, sobre todo si se considera la expresión diferencial de estos receptores dentro del SNC.

Los sistemas dopaminérgicos del SNC han generado gran interés, debido a que diversas alteraciones en la transmisión dopaminérgica han sido relacionadas, directa o indirectamente, con trastornos severos como la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia, así como la adicción a drogas (AMFs y cocaína por ejemplo).

Las neuronas dopaminérgicas y sus proyecciones pueden agruparse en 3 sistemas principales⁷:

1. **Sistemas ultracortos.** Un primer sistema está formado por las células dopaminérgicas del bulbo olfatorio, en tanto que un segundo sistema lo componen las neuronas interflexiformes (similares a las amacrinas) presentes entre las capas plexiformes interna y externa de la retina.
2. **Sistemas de longitud intermedia.** Incluyen: a) el sistema tuberohipofisario, con origen en las células dopaminérgicas localizadas en los núcleos hipotalámicos arqueado y periventricular, cuyos axones terminan en el lóbulo intermedio de la hipófisis y en la eminencia media; b) neuronas localizadas en el hipotálamo dorsal y posterior, que envían proyecciones al hipotálamo dorsal anterior y a los núcleos septolaterales; y c) el grupo periventricular medular, que incluye a las neuronas dopaminérgicas localizadas en la periferia de los núcleos del tracto solitario y motor dorsal del nervio vago, así como a las células dispersas en la prolongación tegmental de la materia gris periacueductal.
3. **Sistemas largos.** Este grupo incluye a las neuronas de la región retrorubral, del área tegmental ventral y de la sustancia negra compacta, las que envían proyecciones a tres regiones principales: el nigroestriado (núcleos caudado y putamen), la corteza límbica (entorrinal, perfrontal medial y cíngulo) y otras estructuras límbicas (el septum, el tubérculo olfatorio, el núcleo Accumbens, la amígdala y la corteza piriforme). Dentro de este grupo se encuentran dos de las vías dopaminérgicas más importantes, la vía nigroestriatal y la vía mesolímbica.

El subtipo D₁ es el receptor dopaminérgico más abundante en el SNC. Niveles altos del receptor se encuentran en el tubérculo olfatorio, el neoestriado, el núcleo Accumbens, las islas de Calleja, la amígdala, el núcleo subtalámico, la sustancia negra (reticulada y compacta) y el cerebelo (capa molecular)¹⁹. Estos receptores muestran una afinidad relativamente baja por la

DA. Típicamente la activación de los receptores D₁ conduce a la activación de proteínas G_s con la consecuente producción del segundo mensajero AMPc por estimulación de una o varias isoformas de la enzima adenilil ciclasa, localizada en la membrana celular⁷.

Las características farmacológicas del subtipo D₅ son también similares a las reportadas para el receptor D₁, sin embargo, su afinidad por la DA es mayor. El receptor D₂ ha sido detectado en alta densidad en el neostriado (neuronas GABAérgicas estriadopalidales), el tubérculo olfatorio, la capa molecular de la formación hipocampal, el núcleo Accumbens, las islas de Calleja y el área tegmental ventral^{15, 30, 35}. El receptor D₂ muestra una baja afinidad por la DA. Existen evidencias de que los receptores D₂ se encuentran acoplados a proteínas G del tipo G_{ai} o G_{ao}, sensibles a la inactivación por la toxina de *Bordetella pertussis*¹⁴. Típicamente la activación del receptor conduce a la inhibición de la adenilil ciclasa y por tanto de la formación de AMPc. Los receptores D₂ pueden también modular corrientes iónicas, en particular las activadas por voltaje, inhibiendo canales de Ca²⁺ (efecto presumiblemente mediado por proteínas G_{ao}) o facilitando la apertura de canales de K⁺ mediante proteínas G_{i3}.

En lo que respecta a los receptores D₃ hay niveles elevados en las islas de Calleja, la región septal, los núcleos geniculados medial y lateral del tálamo, el núcleo mamilar medial del hipotálamo y en las células de Purkinje del cerebelo^{19,35}. Densidades intermedias se observan en la corteza parietal y temporal, la formación hipocampal, el bulbo olfatorio, el neostriado, el núcleo Accumbens, la amígdala, el núcleo subtalámico, la oliva inferior y los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis. El receptor D₃ muestra una afinidad mayor por la DA y por la mayoría de los agonistas dopaminérgicos que la correspondiente a los receptores D₂. El receptor D₃ es el autorreceptor presente en las terminales dopaminérgicas, donde regula la síntesis y la liberación de DA^{35, 55, 62}.

Los procesos bioquímicos involucrados en la expresión de la sensibilización son menos conocidos. En la expresión participan de modo importante el núcleo *accumbens*, la corteza prefrontal, la amígdala y el estriado dorsal, regiones incluidas en el sistema corticoestriatoamigdalino⁴¹. Se sabe que la expresión de la sensibilización requiere la activación de proyecciones de glutamato desde la corteza prefrontal dorsal hasta el centro o *core* del núcleo *accumbens*. Además, se requiere una hiperactividad dopaminérgica en el núcleo *accumbens* y la amígdala, aunque probablemente hay una pérdida del tono inhibitor

dopaminérgico en la corteza prefrontal, lo que a su vez disminuiría el control inhibitorio de ésta sobre el núcleo *accumbens* y otros centros, principalmente la amígdala en su porción basolateral (ABL). Se ha descrito que el aumento de DA en la corteza prefrontal facilita la actividad de las neuronas de ésta (se sitúan en actividad rítmica de disparo o *up-state*), lo que disminuye la actividad neuronal en la ABL y, además anula la entrada cortico sensorial sobre la ABL^{28,51}. Por lo tanto, en el estado sensibilizado, se pierde la acción inhibitoria de la corteza prefrontal sobre la ABL (por probable hipo actividad dopaminérgica en la corteza prefrontal), además de aumentar la actividad de la ABL por incremento de la acción dopaminérgica desde el ATV. Estos hechos conllevan una mayor actividad glutamatérgica desde la ABL sobre el núcleo *accumbens*, lo que podría facilitar cambios plásticos en éste que reforzarían la sensibilización.

Estos cambios plásticos se definirían en forma de establecimiento de circuitos funcionales nuevos o engramas, cuya activación podría ser la base neuronal de la ‘motivación’ por la droga. Todos estos hechos neuroquímicos concuerdan con la teoría actual sobre la adicción que combina un aumento de respuestas condicionadas asociadas al uso de la droga, junto a una pérdida de control inhibitorio que daría lugar a la impulsividad del consumo⁴⁷.

El estriado, tanto en su porción ventral (núcleo *accumbens*) como dorsal, desempeña un papel crítico en los cambios adaptativos al consumo crónico de droga que llevan a la adicción. La inicial actividad dopaminérgica aumentada desde el ATV sobre el núcleo *accumbens* facilitaría la formación de aprendizaje pavloviano e instrumental que caracteriza a la adicción, el cual se consolidaría en forma de hábito en el estriado dorsal. Estos hechos se relacionan también con la sensibilización dopaminérgica mantenida⁹ y con la aparición de hipersensibilidad de receptores D₁ en el núcleo *accumbens* tras la administración crónica de psicoestimulantes. El aumento de sensibilización locomotora por hipersensibilidad D₁ se demuestra porque los ratones mutantes sin receptores D₁ no denotan un incremento progresivo de la locomoción tras el tratamiento repetido con morfina³⁶. Los receptores D₃ en el núcleo *accumbens* también se sensibilizan tras la administración de psicoestimulantes como la cocaína.

Se cree que la acción dopaminérgica (a través de receptores D₁ y D₃) facilita el establecimiento de circuitos neuronales estables o engramas en el núcleo *accumbens*, pues la

DA ‘da paso’ a la acción glutamatérgica desde la corteza prefrontal y la BLA sobre las neuronas del núcleo *accumbens* (y probablemente desde el hipocampo) activándolas¹¹.

La formación de nuevos engramas neuronales es un requisito para el establecimiento de ‘motivación’ de búsqueda de droga (desempeñando un papel crítico el núcleo *accumbens*), así como de hábitos motores anómalos (teniendo en este caso el estriado dorsal el papel predominante). La hiperactividad dopaminérgica en el estriado, tanto ventral como dorsal, se asocia a una mayor síntesis y liberación de DA en las terminales mesolímbicas y nigroestriatales, relacionada con mecanismos similares a los ya explicados respecto a la sensibilización en el ATV. O sea, existiría una fosforilación de proteínas como tirosinhidroxilasa y sinapsina I a través del incremento de calcio intracitoplásmico y de las vías de cinasa como CaMK II y PKC¹⁸. De este modo, el consumo continuado de la droga establece circuitos motores estables o engramas probablemente diseñados para el aprendizaje del consumo³. El uso compulsivo de la droga se caracteriza por ser una conducta inflexible de hábito que persiste a pesar de sus costos negativos considerables sobre el adicto, y se estimula fácilmente por estímulos asociados al consumo⁶. Una hipótesis establece que, una vez se consolidan las actividades neuronales del circuito corticoestriatoamigdalino que participan en el aprendizaje de consumo de la droga (incluyendo aspectos cognitivos de recompensa), se generaría una espiral ventrodorsal en el estriado de tal modo que se ‘transfiere’ la información al estriado dorsal y se consolidan circuitos de hábito locomotor muy estables. Los mecanismos moleculares no se conocen con precisión, pero parecen ser semejantes a los que suceden en el núcleo *accumbens*. En todo este proceso, la sensibilización dopaminérgica mantenida sería fundamental. A este respecto es muy interesante que, en monos, se ha observado que la expresión del transportador de DA aumenta desde el núcleo *accumbens* al estriado dorsal en la transición del estado agudo al crónico de administración de cocaína, lo que podría ser un marcador de la transferencia de información entre el estriado ventral y el dorsal²⁷.

Cada vez son más los estudios que muestran como el empleo crónico de MFD tiene el riesgo de provocar los mismos efectos adictivos de otros psicoestimulantes; por ejemplo la aplicación de Metilfenidato en ratas induce un fenómeno conocido como sensibilización, en el cual la respuesta al fármaco incrementa significativamente después de un periodo de no administración del mismo, lo que supone que este fenómeno de sensibilización es el

equivalente al de adicción en los humanos, ya que los mecanismos neurobiológicos son muy similares.

Por otro lado existen múltiples reportes en la literatura científica que muestran la similitud funcional a nivel celular de los tres psicoestimulantes y las grandes diferencias en cuanto a sus efectos conductuales. Se desconocen los mecanismos íntimos a nivel del Núcleo Accumbens que son modificados por el Metilfenidato, lo cual podría explicar las diferencias adictivas entre este fármaco y la cocaína.

Existen controversias sobre la porción del Núcleo Accumbens que participa en estos procesos de “recompensa”. Este Núcleo posee una región ventromedial o periférica y una región nuclear o central; ambas regiones poseen sistemas dopaminérgicos y glutamatérgicos.

Esto es relevante porque las regiones nuclear y periférica poseen distintas proyecciones eferentes y diferentes concentraciones de los subtipos de receptores a DA. Las células de la periferia del Núcleo Accumbens se proyectan especialmente hacia el área ventral tegmental, mientras que las células del Núcleo lo hacen hacia la zona compactada de la sustancia negra y ambas también proyectan hacia la corteza prefrontal.

Además para realizar un tratamiento eficaz del TDAH con la menor cantidad de efectos colaterales requerimos describir el mecanismo celular de acción del Metilfenidato en el Núcleo Accumbens.

Objetivo General

- Determinar la participación de las neuronas dopaminérgicas del núcleo Accumbens, en los efectos locomotores inducidos por el MFD, para determinar la importancia de estas en el proceso de sensibilización al fármaco.

Objetivos Específicos

- Determinar si la lesión específica de las neuronas dopaminérgicas, inducida por la administración de 6-OHDA en Núcleo Accumbens, modifica la génesis o la manifestación del proceso de sensibilización al Metilfenidato, comparándolo con lo que ocurre con la amfetamina.
- Describir si el efecto de la modificación de la actividad dopaminérgica (inducida con el empleo de bloqueadores de receptores a la DA) en las neuronas del Núcleo Accumbens altera el proceso de sensibilización hacia Metilfenidato y a la amfetamina.
- Describir si el empleo de agonistas dopaminérgicos del tipo de la apomorfina modifica el proceso de sensibilización al metilfenidato y a la amfetamina.
- Analizar qué tipo de receptor dopaminérgico del Núcleo Accumbens está involucrado en el proceso de sensibilización a Metilfenidato y a la amfetamina.

Hipótesis

Si la sensibilización inducida por Metilfenidato involucra sistemas dopaminérgicos específicos del Núcleo Accumbens, al modificar estos sistemas en el mismo, se inducirán cambios importantes en el proceso de sensibilización a este estimulante.

Una vez determinadas las estructuras y vías que participan en la sensibilización por Metilfenidato, será posible diseñar un mecanismo que lo modifique para evitar la posterior adicción a los psicoestimulantes en niños con TDAH que consumen metilfenidato.

Materiales y Método

Material biológico

132 Ratas macho preadolescentes (90-110 g) de la cepa Wistar, distribuidas de la siguiente manera:

- Grupo 1 (n=37) considerado como grupo control
- Grupo 2 (n=47) grupo pretratado con 6-OHDA
- Grupo 3 (n=24) grupo tratado con Haloperidol
- Grupo 4 (n=24) grupo tratado con Apomorfina

Material no biológico

- Equipo de disección (pinzas, bisturí, espátulas, etc)
- Equipo estereotáxico completo de la marca David Kopf (marco, manipulador de 3 dimensiones, 2 lápices metálicos, torre de inyección)
- Equipo Versamax de la marca AccuScan
- Taladro quirúrgico
- Tornillería
- Desarmadores
- 48 cánulas
- Cemento acrílico
- Vidrio de reloj
- Balanza
- Jeringas para insulina
- Sonda (para administración intracraneal)
- Solución salina isotónica
- Solución de Metilfenidato

- Solución de Amfetamina
- Solución de Haloperidol
- Solución de Apomorfina
- Anestésico 2,2,2-tribromoetanol (TBE)
- Xylocaína + epinefrina (anestésico local)

Preparación de soluciones

- Solución Salina Isotónica (SSI) 0.9%: se preparó 500mL de solución a una concentración de 0.9% p/v; para ello se pesaron 4.5g de NaCl (de la marca J.T. Baker con un ensayo del 100%) posteriormente se diluyeron y llevaron al aforo con agua des ionizada.
- Formaldehido 10% v/v: se preparó 500mL de solución a una concentración de 10% v/v; para ello se tomaron 130mL de una solución de formaldehído al 38.5%, y se llevaron al aforo con solución salina.
- 2,2,2-Tribromoetanol (TBE)2%: para su preparación se pesaron 0.5g de 2,2,2-Tribromoetanol (de la marca Aldrich) se adicionaron 2.5mL de Etanol al 70% y finalmente 22mL de SSI 0.9%.
- Apomorfina: se preparó una solución de Apomorfina a una concentración de 10 mmol/ml, administrándose 2µl intracerebralmente, una vez preparada la solución se protegió de la luz para evitar su oxidación.
- Haloperidol: se preparó una solución de Haloperidol a una concentración de 10 mmol/ml, administrándose 2µl intracerebralmente.
- Amfetamina: se preparó una solución de amfetamina a una concentración de 2mg/ml, administrándose una dosis de 0.1ml/100g de peso, la dosis recomendada para ratas es de 2mg/Kg de peso.

- Metilfenidato: se preparó una solución a una concentración de 1.25mg/ml, administrándose a una dosis de 0.2ml/100g de peso, la dosis recomendada de Metilfenidato para ratas es 2.5mg/kg de peso.

Metodología

Se emplearon ratas de la cepa Wistar, machos pre-adolescentes de entre 90 y 110 gramos (n=132). Todos los animales se mantuvieron en un bioterio con temperatura controlada, con ciclos de 12/12 horas de luz/oscuridad (luz de 7:00 am a 7:00 pm). En cajas medianas de almacenamiento, las cuales tenían el piso cubierto con viruta de madera y por techo una reja de alambre. Cada caja contenía 2 ratas que tenían acceso libre al alimento y al agua. Antes del experimento, todos los animales permanecían en este ambiente durante 2 a 3 días. Una vez iniciado el experimento cada animal se pesaba individualmente en una báscula digital (Ohaus, Toledo, USA) diariamente. El total de animales (n=132) fue dividido aleatoriamente en 4 grupos experimentales: grupo control (n= 37), grupo tratado con 6-hidroxidopamina (n=47), grupo tratado con Haloperidol (n=24) y el grupo tratado con Apomorfina (N=24).

Grupo control

El total de animales asignados a este grupo se dividieron a su vez en 3 subgrupos de acuerdo al tratamiento que recibieron. El primer subgrupo (n=15) recibieron la aplicación intraperitoneal (i.p.) de 500µl de solución salina isotónica. El siguiente subgrupo (n=12) recibió la aplicación de 2.5mg/kg de Metilfenidato (MFD) disueltos en 500µl de solución salina isotónica. Finalmente el tercer subgrupo (n=10) recibió la aplicación i.p. de una dosis de 2mg/kg de Amfetamina (AMF) disuelta también en 500µl, de solución salina isotónica.

El protocolo empleado para el desarrollo de la sensibilización a los psicoestimulantes fue el siguiente: después de pesar a los animales el día 1, se introducían en la caja de registro de la actividad locomotriz y permanecían en ella durante 30 minutos, con el objetivo de reducir al máximo el estrés provocado por un ambiente nuevo. Transcurridos los 30 minutos se iniciaba el

registro durante una hora registrándose cualquier movimiento (tanto horizontal como vertical) que el animal realizaba. Al finalizar la hora de registro el animal es retirado de la cámara y recibió una aplicación i.p. de 500µl de solución salina con el fármaco correspondiente según al subgrupo al que pertenecía. Inmediatamente después de la aplicación el animal era vuelto a colocar en la cámara de registro y su actividad locomotriz era registrada nuevamente durante 60 min más. Finalizados estos, el sujeto fue retornado a su caja y mantenido en las condiciones del bioterio nuevamente. Durante cada uno de los 3 días siguientes y a la misma hora, el sujeto recibió una nueva aplicación de 500µl de solución salina que contenía el fármaco correspondiente dependiendo del subgrupo al que pertenecía. Durante los 3 días siguientes los sujetos no reciben tratamiento alguno y no es hasta el 8avo día cuando son sometidos nuevamente al registro de la actividad locomotriz, a la aplicación i.p. del fármaco en las mismas condiciones y finalmente al registro nuevamente de la actividad locomotriz durante una hora.

Grupo experimental 1 (6-OHDA)

Después del periodo de 2 a 3 días de aclimatación al ambiente del bioterio, los animales de este grupo se sometieron a una intervención quirúrgica para la aplicación *in situ* en el núcleo accumbens de 6-hidroxidopamina (6-OHDA, una neurotoxina que destruye neuronas catecolaminérgicas). Para ello los animales fueron anestesiados con la aplicación i.p. de tribromoetanol (Sedalphorte^{MR}) a una dosis de 0.1 ml/kg. Una vez en estado anestésico, se eliminaba todo el pelo del cuero cabelludo y posteriormente se montaba al animal en un aparato estereotáxico (David Koff, CA, USA), el cual le fijaba completamente la cabeza colocando dos lápices de metal en las orejas, de este modo se evitan movimientos laterales, además de colocar una barra metálica en el hocico para impedir movimientos de arriba hacia abajo (fig. 4).

Una de las torres del instrumento estaba calibrada de acuerdo a las coordenadas del aparato para alcanzar el núcleo accumbens. Sobre esta torre se montaba una aguja de carpule del no. 27g, la cual a través de un tubo de polietileno, se conectaba a una microjeringa. Cada vez que la microjeringa rotaba una vuelta inyectaba 1 µl de solución (Fig. 5). La solución de 6-OHDA se preparaba inmediatamente antes de su aplicación, para ello, 2 mg de 6-OHDA se disolvían en 1

ml de una solución de ácido ascórbico al 5% (con la finalidad de retardar al máximo la oxidación de la 6-OHDA). Con esta solución se purgaba el tubo de polietileno y la aguja de carpule.

Posteriormente se hacía un corte longitudinal del cuero cabelludo y se legraba ambos huesos temporales en su línea media, visualizando con ello la sutura bregma. Con una pequeña broca (1mm de diámetro) se perforaban dos pequeños orificios en el hueso exactamente en las coordenadas del núcleo accumbens, las cuales se tomaron de la segunda edición del libro “A stereotaxic Atlas of the Rat Brain” de Louis J. Pellegrino, siendo: Antero-Posterior: 3 mm (a partir de Bregma), Lateral: 1.5 mm y Profundidad: 6 mm (a partir del cráneo), con un ángulo de la cabeza de 5 mm de elevación.



Fig. 4. Montaje de un animal en el equipo estereotáxico.

Posteriormente se descendía con la torre la aguja de carpule hasta alcanzar el núcleo, para a continuación iniciar la inyección muy lentamente. Se aplicó 1 μ l de la solución, lo que corresponde a 2 μ g de 6-OHDA, El tiempo para cada aplicación fue de 2 minutos por lado. Una vez finalizada la aplicación se extraía la aguja, se ponía cera de hueso en los pequeños orificios y se suturaba la piel. Cuando el animal era liberado del estereotáxico se colocaba en un ambiente caliente y se vigilaba hasta que recuperaba su estado de alerta. Después de 3 días de recuperación, los animales se sometían exactamente al mismo procedimiento que el grupo anterior durante los 8 días subsiguientes, con la finalidad de inducir un estado de

sensibilización a los psicoestimulantes (MFD y AMF). Del total (n=47) de animales a los que se les aplicó la 6-OHDA, se formaron 3 subgrupos, el primero recibió la aplicación de solución salina (n=16) y los dos siguientes recibieron MFD (n=15) y AMF (n=16), respectivamente.



Fig. 5. Inyección de 6-OHDA a nivel del núcleo accumbens.

Grupo experimental 2 (Haloperidol)

Después de un periodo de aclimatación de las condiciones del bioterio de 2 a 3 días. Los animales de este grupo (n=24) fueron sometidos a una cirugía estereotáxica para la implantación de cánulas crónicas que hacían accesible al núcleo accumbens en animales despiertos. Para realizar esta implantación estereotáxica, los animales fueron anestesiados con la aplicación i.p. de Tribromoetanol (Sedalphorte^{MR}) a una dosis de 0.1ml/kg. Una vez en estado quirúrgico se rasuraba el cuero cabelludo de la región temporo-parietal donde se infiltraba subcutáneamente 0.1ml de Xylocaína al 5% con epinefrina, para eliminar el dolor y disminuir el sangrado en esa región. Se colocó el animal en un aparato estereotáxico (David Kopf), colocando dos lápices de metal en las orejas, mismos que fijarían la cabeza, de este modo evitar movimientos laterales, además de colocar una barra metálica en el hocico para impedir movimientos de arriba abajo. Una vez fija la cabeza se realizó un corte longitudinal en la región cefálica, legándose bien el cráneo y localizando la sutura de bregma. Empleando el atlas estereotáxico de Pellegrino se realizan dos trépanos (2 mm de diámetro) en estos sitios

(fig. 6). Además se hacían tres pequeñas perforaciones en el cráneo en las regiones más anteriores y en una posterior, donde se colocaban tres pequeños tornillos (1mm de ancho 1.5 mm de longitud).

Las cánulas se fabricaban con dos agujas, una del número 23g que servían de base y una aguja calibre 27g la que hacía las veces de mandril. Ambas agujas se recortaban al tamaño adecuado y se eliminaba parte de la base para que se ajustaran perfectamente. Las cánulas se introducen una por una con ayuda de la torre del estereotáxico, una vez en su sitio, estas se fijan a los tornillos, a su vez estos se fijan en el hueso del cráneo, por medio de cemento acrílico. De esta manera las cánulas permanecen fijas y en su lugar.

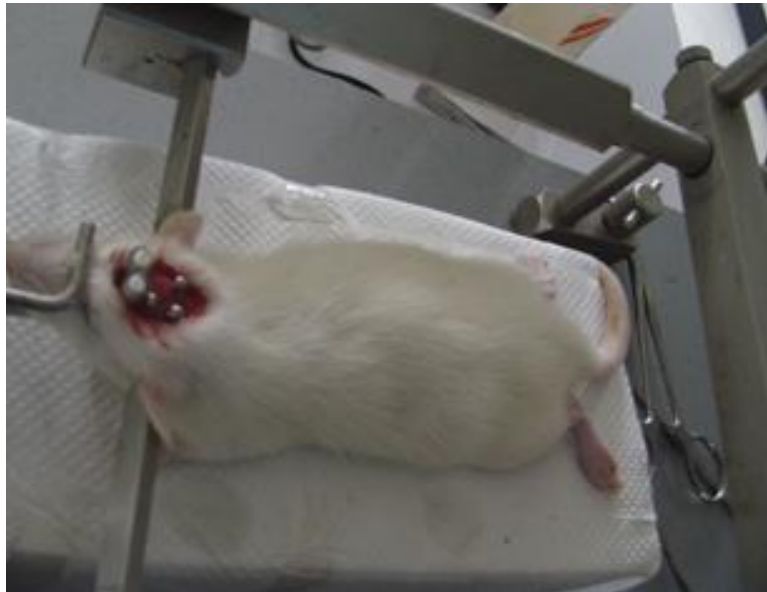


Fig. 6. Implantación de las cánulas

Al fin al de la cirugía, los animales fueron mantenidos en un colchón térmico hasta su recuperación. De 2 a 3 días después, los animales se sometían al mismo paradigma experimental que el resto de los sujetos, sólo que estos animales en el día 1 y el día 8 recibían una aplicación intra-núcleo accumbens de de 2 μ l de una solución que contenía Haloperidol (10 μ mol/ μ l), después de la primera hora de registro y 5 minutos antes de la aplicación del psicoestimulante.

Para realizar la aplicación intra-accumbens, se extraía el mandril de la cánula y se introducía una aguja de carpule conectada a un tubo de polietileno de 2 mm de diámetro, la cual a su vez estaba conectada a una microjeringa de 10 μ l de capacidad. El sistema se purgaba instantes antes de la inyección y la microinyección de los 2 μ l de solución que se aplicaba por cada núcleo accumbens se realizaba en un periodo de 2 min (fig. 7).

Después de 5 minutos, se realizaba la aplicación i.p. de ya sea SSI, MFD o AMF, dependiendo del subgrupo experimental al que pertenecía el sujeto. Al final de ambas aplicaciones, los animales fueron nuevamente colocados en las cámaras de registro y su actividad locomotriz fue monitoreada durante 60 min más.



Fig. 7. Aplicación intra-accumbens

Grupo Experimental 3 (Apomorfina)

Los sujetos que conformaron este grupo (n=24) fueron mantenidos en condiciones del bioterio de 2 a 3 días antes de empezar cualquier maniobra experimental. Después de este periodo de adaptación se implantaron cánulas de acero inoxidable similares a las utilizadas en

el grupo anterior. La única diferencia del procedimiento experimental entre este grupo y el anterior, residía en el hecho de que en lugar de aplicar el haloperidol a través de la cánula lo que se aplicaba era apomorfina. Se inyectaron también 2 μ l de una solución de apomorfina que tenía una concentración de 10 μ mol por cada μ l. El resto del procedimiento ya fue descrito en el grupo anterior.

Al finalizar el registro del día 8, los animales se sacrificaban. Para ello se empleaba un sobre dosis de pentobarbital sódico (80 mg/Kg), con lo cual dejaban de ventilar en un lapso de 15 a 20 minutos. Todos los sujetos que recibieron la aplicación intra-accumbens de 6-OHDA y aquellos en los cuales se implantaron cánulas de acero inoxidable en ambos núcleos accumbens fueron perfundidos con solución salina isotónica adicionada con 10% de formaldehído. Para ello, cuando estaban en un estado profundo anestésico (ausencia de reflejos) se hacía una incisión en la parte anterior del tórax, lo cual exponía al corazón. Se introducía una cánula en el ventrículo izquierdo y con unas tijeras se seccionaba la aurícula derecha

La cánula estaba conectada a una jeringa de 50 ml llena con la solución de perfusión y ésta se empujaba a través del ventrículo izquierdo para eliminar toda la sangre de la rata, incluyendo al cerebro. Después de perfundir toda la solución, con unas gubias se cortaba el cráneo poco a poco, hasta extraer las cánulas en los animales implantados. El cerebro se extraía y se guardaba en un frasco que contenía 10 ml de formaldehído al 10%, durante 2 semanas al menos. Transcurrido este tiempo los cerebros se colocaba sobre una matriz laminada y con una navaja se obtenían rebanadas de cerebro de aproximadamente 300 μ m sobre las cuales se identificaban la punta, tanto de la aguja de carpule, que se empleo para inyectar la 6-OHDA, como la punta de las cánulas empleadas en la administración intra-accumbens de haloperidol y apomorfina.

El registro de la actividad locomotriz se realiza por medio del sistema computarizado de Accuscan Instruments.

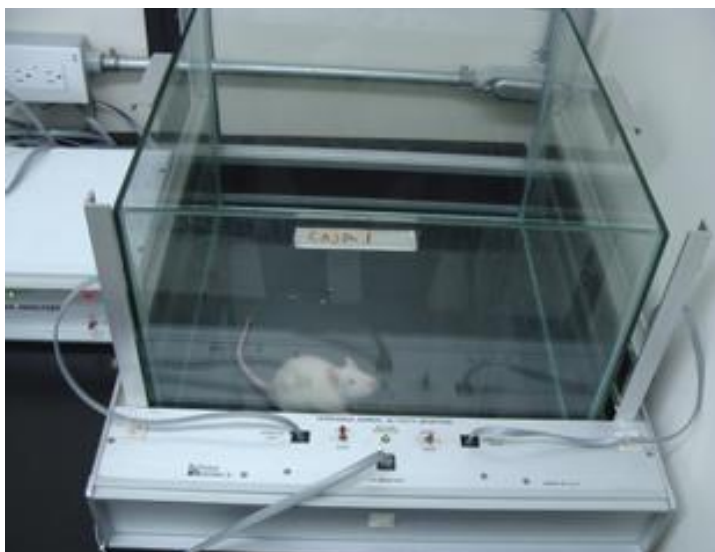


Fig. 8. Equipo para el registro de la actividad locomotora.

El cual consta de una caja de vidrio transparente de 6 mm de espesor, 40 cm de ancho, 40 cm de largo y 28.6 cm de altura. Esta caja se localiza dentro de un marco de 43x43cm de ancho y largo y de 10 cm de altura (Fig. 8). Cada lado de estos marcos posee varias celdillas fotoeléctricas y cada una emite un haz de luz, esto forma dentro de la caja de vidrio una retícula de cuadros de 10 x 10 cm. Estas celdillas fotoeléctricas están conectadas a una interface que a su vez se conecta con la computadora y un software (Versamax) realiza el procedimiento de adquisición, almacenaje y muestreo de la información. Cada vez que el animal se desplaza interrumpe el haz de luz, lo cual detecta la interface y la computadora lo almacena como una cuenta. Se programa a la computadora para que una vez iniciado el programa cada 10 min, emita un total de número de cuentas y posteriormente lo muestre de acuerdo al tiempo que transcurre el animal dentro de la caja de registro. Por arriba del marco existe otras dos barras con celdillas fotoeléctricas que detectan la actividad vertical, tienen el mismo mecanismo que las barras inferiores, pero los haces sólo se interrumpen si el animal se para en sus patas posteriores, por lo que entonces sólo registran la actividad vertical (Fig 9).



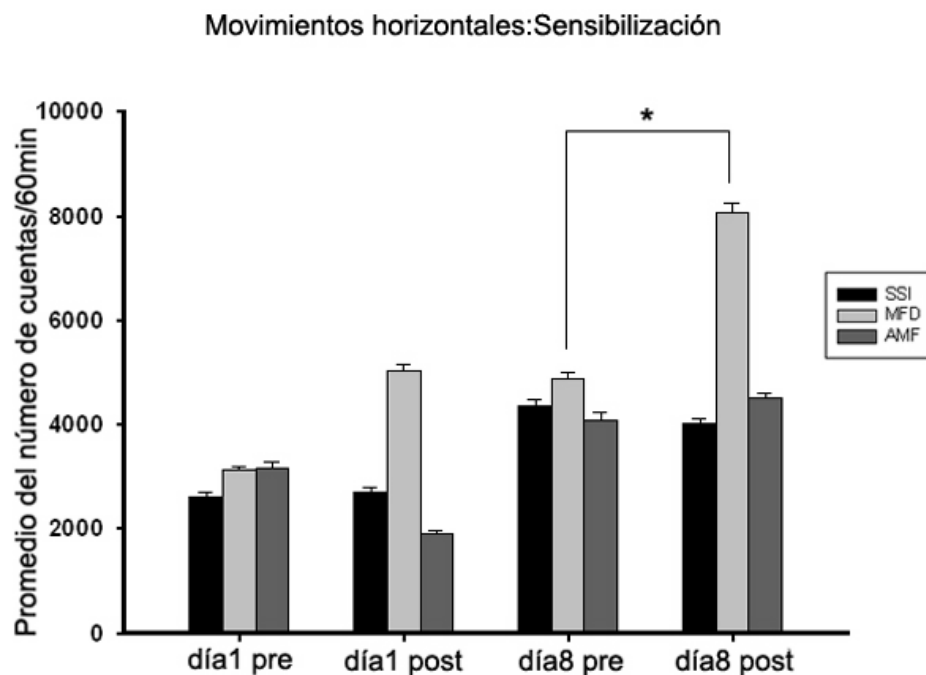
Fig. 9. Se muestran las barras laterales que detectan la actividad vertical.

La interface del Accuscan posee una entrada para registrar hasta 16 cajas en forma simultánea. Debido a que nuestro laboratorio sólo posee 2 marcos de celdillas fotoeléctricas, sólo nos fue posible registrar a dos ratas simultáneamente.

Los datos obtenidos de la computadora por el programa de Versamax, fueron agrupados en periodos de 60 min previos a la aplicación ya sea de SSI, MFD o AMF, para ser comparados estadísticamente, empleando la prueba de T-Correlacionada para muestras dependientes, con los valores agrupados obtenidos en los subsiguientes 60 min posteriores a la aplicación del fármaco. Para detectar la presencia o ausencia de sensibilización, comparamos los valores obtenidos en los 60 minutos posteriores a la administración del psicoestimulante del día 1 con el número registrado en los 60 minutos posteriores a la administración del mismo psicoestimulante en el día 8, para ello empleamos la prueba de T de Student. Se consideró como un cambio estadísticamente significativo sólo si la probabilidad de que se rechace la hipótesis nula era igual o menor a $p < 0.05$.

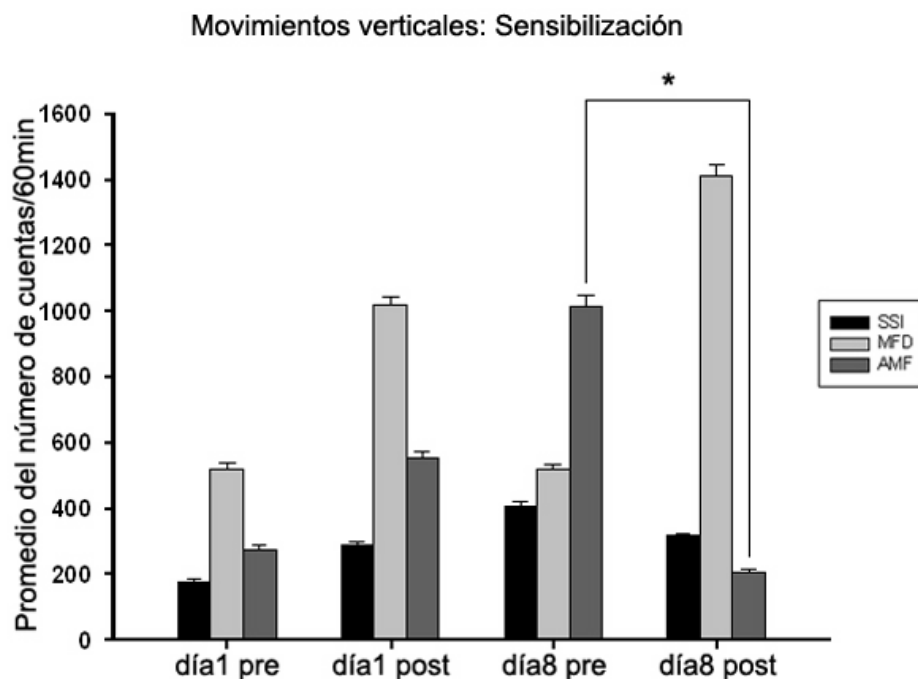
Resultados

Cuando los sujetos eran introducidos dentro de la cámara de registro, su actividad locomotriz correspondía al de una actividad exploratoria característica de un ambiente nuevo. Conforme el tiempo transcurría el animal se adaptaba al ambiente y su movilidad disminuía. Algunos de ellos presentaban una inmovilidad total e incluso mostraba una conducta de sueño. Con la aplicación del psicoestimulante la situación era diferente y la actividad locomotriz se modificaba. Nunca se observó alguna conducta locomotriz diferente a una mayor movilidad locomotriz, es decir no se observaron movimientos anormales convulsivos, impulsivos o agresivos. El animal siempre fue dócil a la manipulación. Los resultados se reseñan a través de la descripción de las graficas obtenidas.



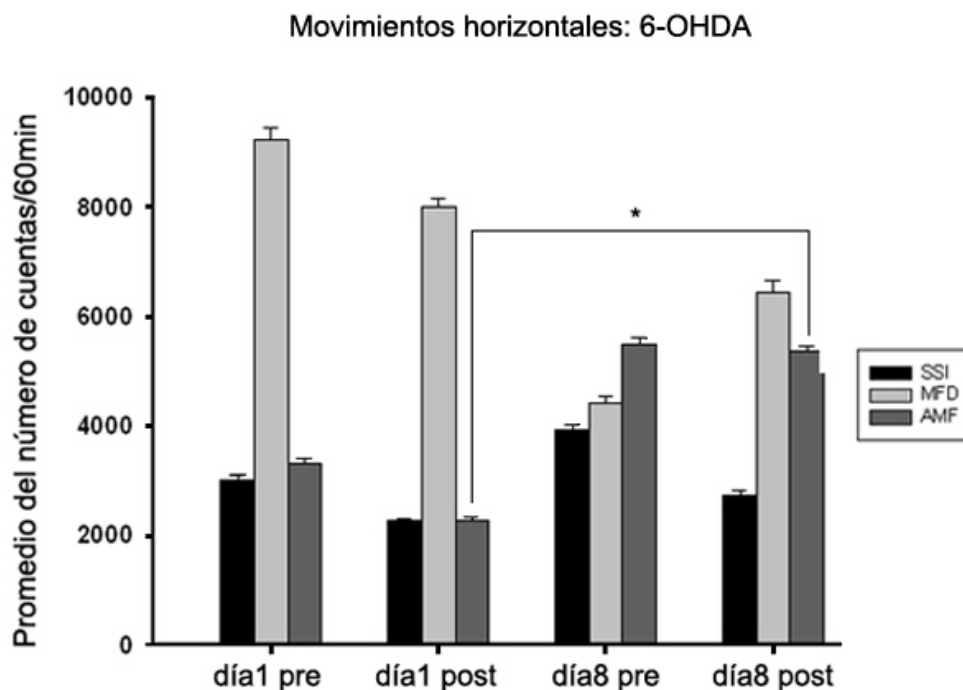
Gráfica. 1.- En este gráfico se observa el promedio del número de cuentas provocado por la actividad locomotriz que presentan los animales antes (pre) y después (post) de la aplicación del fármaco. Se muestran los resultados de los grupos tratados con Solución Salina Isotónica (SSI), Metilfenidato (MFD) y Amfetamina (AMF). Durante la primera administración (día1) y durante la administración del día 8 de este experimento. Durante el periodo comprendido del día 1 al día 8, los animales recibieron una administración diaria durante 4 días seguidos y en

los 3 días restantes no recibieron tratamiento alguno. En el caso de los animales controles que recibieron solución salina se muestra que durante el día 1 el número de cuentas pre (2604.4 ± 88.35) y post (2699.6 ± 103.87) administración son muy similares aunque hay un ligero incremento de la actividad post-administración. En el caso del MFD, se observa un incremento importante en el promedio del número de cuentas, ya que este, pasó de (3117.66 ± 88.06) pre a (5017.25 ± 126.96) post-administración, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo. En el caso de la AMF el promedio del número de cuentas decrece tras el tratamiento y éste va de (3160.1 ± 133.12) pre, a (1892.3 ± 65.66) post-administración, decremento que sin embargo no es estadísticamente significativo. En lo que respecta al día 8, los grupos experimentales tratados MFD y AMF mostraron un incremento en el número de cuentas, al pasar de (4875.25 ± 125.53) y (4086.6 ± 150.24) pre-administración a (8080.08 ± 181.38) y (4513.4 ± 91.17), respectivamente. Aunque solo los animales tratados con MFD mostraron un incremento que fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$).



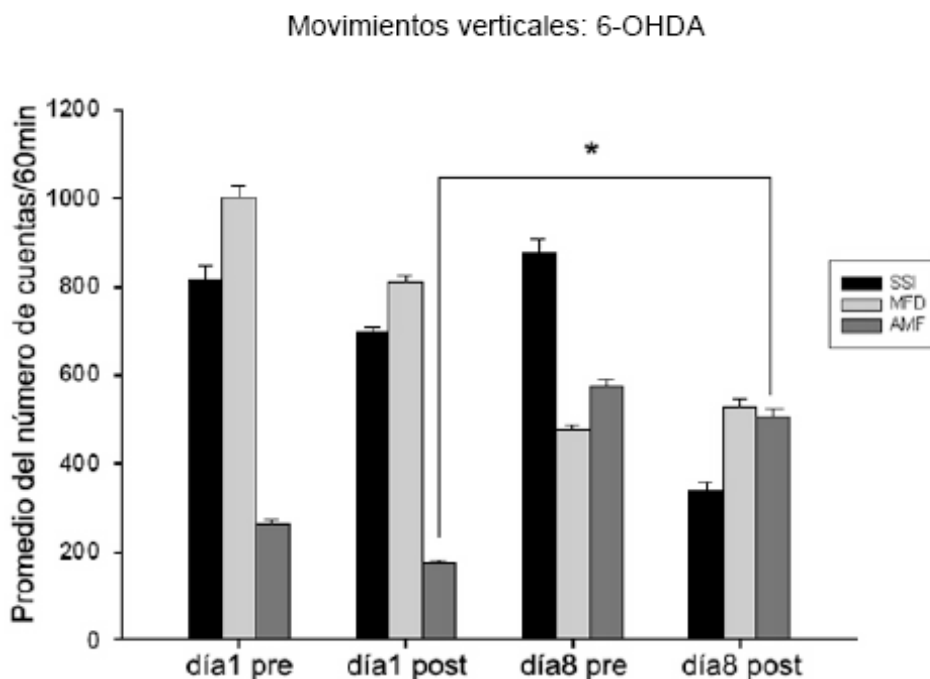
Gráfica. 2.- Se muestra el promedio en el número de cuentas, que representan los movimientos verticales registrados simultáneamente con los resultados obtenidos en la gráfica 1. En el día 1 se hace notable el incremento de tal actividad en los sujetos inyectados con alguna de las 3 soluciones (SSI, MFD y AMF). Esta actividad se incremento de un valor de (177.7 ± 9.00), (522.0 ± 19.49) y (273.7 ± 14.97) pre a (290.8 ± 11.23), (1018.5 ± 27.35) y (556.7 ± 18.77) post-

administración, respectivamente. Se muestra un incremento importante para el caso de la aplicación del MFD, aunque este no es significativo estadísticamente ($p < 0.045$). Para el día 8 los resultados fueron diferentes, en primer lugar, los grupos tratados con SSI y AMF, mostraron una reducción considerable en el promedio del número de cuentas al pasar de (409.13 ± 11.42) y (1016.5 ± 33.26) pre a (317.13 ± 9.14) y (208.7 ± 8.82) post-administración, respectivamente. En este el decremento inducido por la AMF fue estadísticamente significativo ($p < 0.025$). Mientras que el grupo tratado con MFD, mostró un incremento importante en tal actividad al pasar de (522.75 ± 13.10) pre a (1414.33 ± 30.58) post-administración, aunque este no fue estadísticamente significativo ($p < 0.064$)



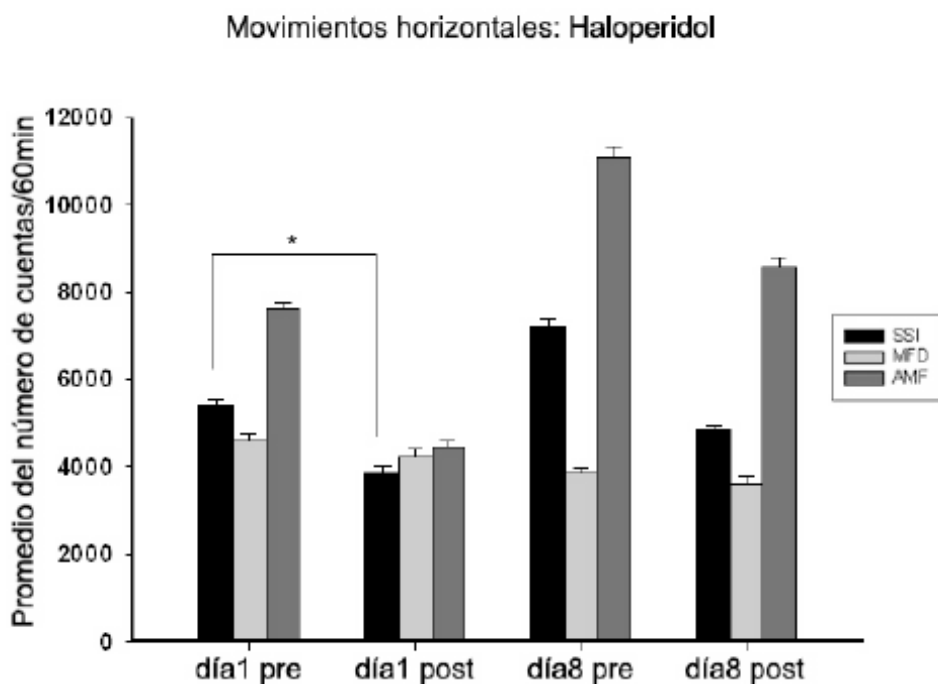
Gráfica 3.-En este grafico se muestra el promedio del número de cuentas provocado por la actividad locomotriz que llevan a cabo los animales antes (pre) y después (post) de la aplicación del fármaco. Se muestran los resultados de los grupos tratados con Solución Salina Isotónica (SSI), Metilfenidato (MFD) y Amfetamina (AMF), a los cuales se les había administrado previamente $2\mu\text{g}$ de 6-OHDA en el núcleo accumbens (dosis única). Durante la primera administración (día1) y durante la administración del día 8 de este experimento. Durante el periodo comprendido del día 1 al día 8. Durante el día 1 los 3 grupos de animales (SSI, MFD y AMF), se observa un incremento en el promedio del número de cuentas, los valores fueron (3012.12 ± 95.11) , (9214.13 ± 234.32) y (3314.87 ± 88.63) pre, mientras que los

valores post fueron (2259 ± 41.16) , (7988.06 ± 162.54) y (2263.06 ± 61.67) respectivamente. Ninguno de estos tratamientos mostró algún efecto que fuera estadísticamente significativo. En lo que respecta al día 8, el grupo experimental tratado con MFD muestra un incremento importante no significativo en el promedio del número de cuentas, el valor previo a la administración fue de (4408.46 ± 119.31) , mientras que en la situación post-administración, este valor fue de (6451.6 ± 189.86) . Lo contrario ocurrió con los grupos tratados con SSI y AMF, en estos grupos se observa un decremento el promedio del número de cuentas que va de (3916.06 ± 116.99) y (5476.06 ± 134.13) pre a (2744.87 ± 76.19) y (5358.87 ± 106.33) post-administración respectivamente. En el caso de la AMF este decremento si fue estadísticamente significativo ($p < 0.012$).



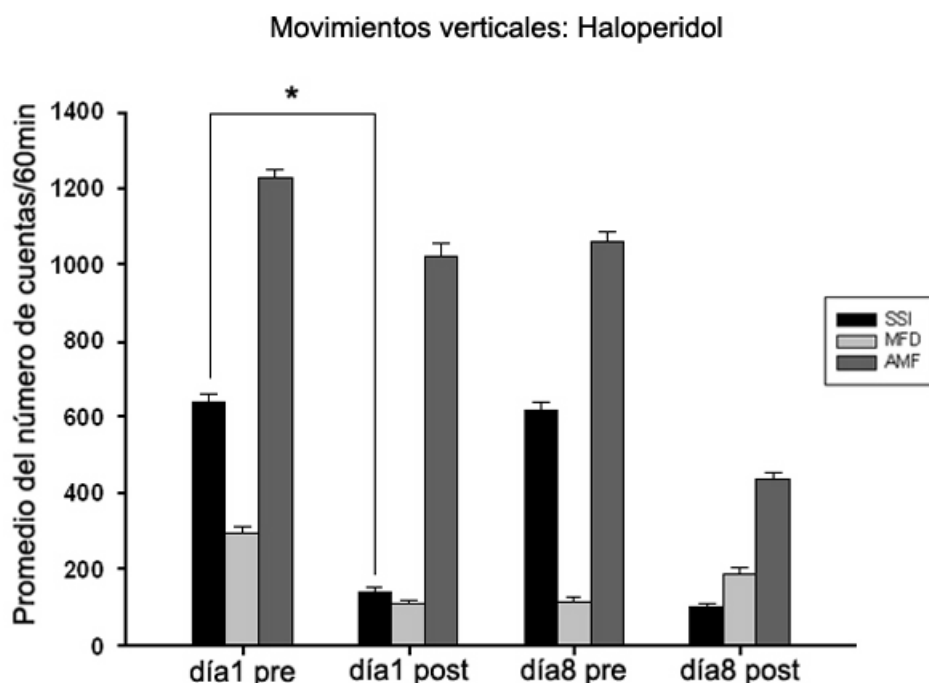
Gráfica 4.-Esta gráfica muestra el promedio del número de cuentas, que representan los movimientos verticales registrados simultáneamente con los resultados obtenidos en la gráfica 3. En el día 1 se hace notable el descenso de los promedio del número de cuentas de tal actividad en los 3 grupos de sujetos tratados (SSI, MFD y AMF), dicha actividad pasó de un valor de (814.06 ± 31.26) , (999.73 ± 26.01) y (262.56 ± 9.34) pre a (695 ± 12.62) , (809.86 ± 14.65) y (172.25 ± 7.40) post-administración, respectivamente. Ninguno de estos números fue estadísticamente significativo. Sin embargo, para el día 8 los resultados fueron diferentes, en el caso del grupo tratado con MFD, ya que este muestra un incremento en el número de cuentas al pasar de (474.93 ± 11.99) pre a (525.6 ± 20.01) post-administración. Mientras que los grupos

tratados con SSI y AMF, mostraron una marcada reducción en tal actividad al pasar de (877.5±29.06) y (573.25±17.00) pre a (340±17.82) y (505±16.22) post-administración respectivamente. Cuando comparamos lo ocurrido el día 1 con el día 8 tanto para los animales tratados con MFD y con AMF, encontramos que hay diferencias estadísticas sólo para el caso de la AMF ($p < 0.03$).



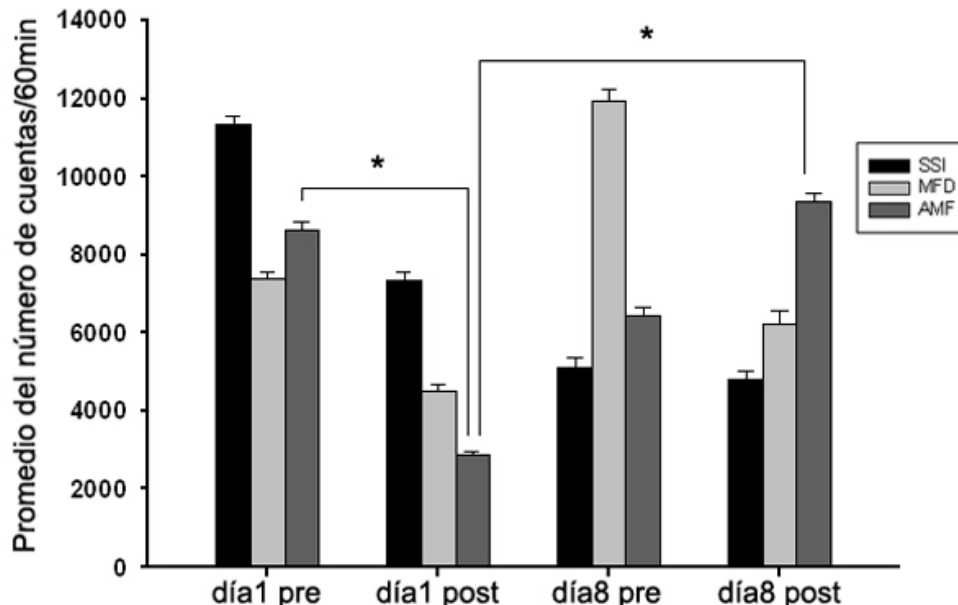
Gráfica 5.-Se observan los resultados de los promedios del número de cuentas provocado por la actividad locomotriz que presentan los animales antes (pre) y después (post) de la aplicación de Solución Salina Isotónica (SSI), Metilfenidato (MFD) y Amfetamina (AMF) combinadamente con Haloperidol. Durante la primera administración (día1) y la administración del día 8 (día 8) de este experimento. En el caso de los 3 grupos de animales SSI, MFD y AMF se muestra que durante el día 1 el número de cuentas previos a la administración fueron (5398.75±155.61), (4619±113.79) y (7630.0±135.64), mientras que para la situación post-administración los valores correspondientes fueron de (3877.87±150.35), (4222.42±199.56) y (4449.5±149.22) respectivamente, observándose un descenso en la actividad, de los cuales sólo el decremento observado con la administración de solución salina fue estadísticamente significativo ($p < 0.023$). En lo que respecta al día 8, los grupos experimentales muestran una reducción en el número de cuentas, el valor previo a la administración es de (7212.5±175.07), (3864.85±128.35) y (11092.25±242.77); mientras que en la situación post-administración,

estos valores fueron de (4851.62 ± 66.38) , (3622.28 ± 187.98) y (8591.25 ± 217.07) respectivamente. Ninguno de estos valores mostró alguna diferencia estadísticamente significativa.



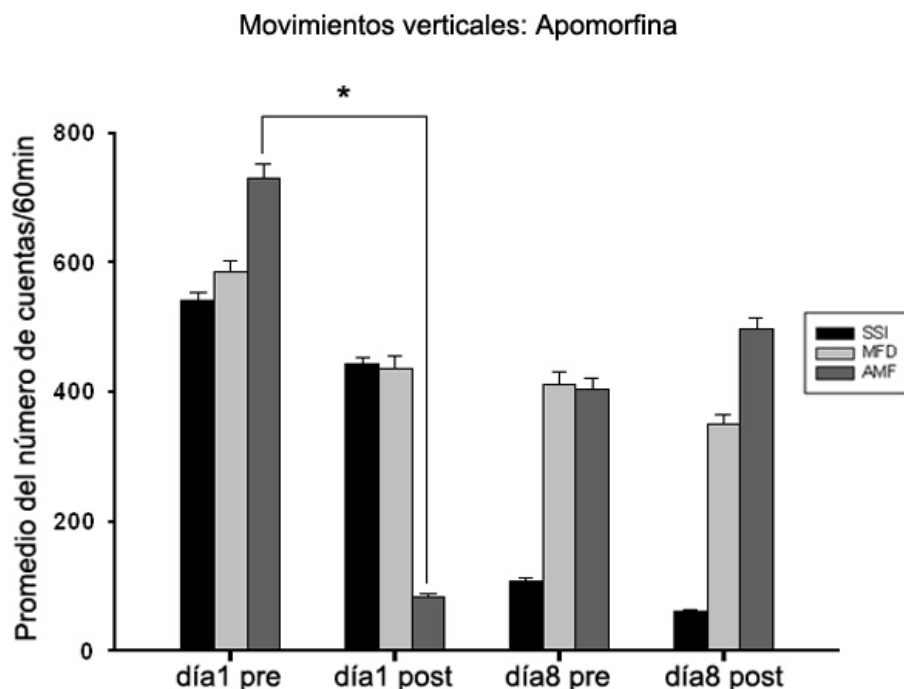
Gráfica 6.-Se muestran los promedios del número de cuentas, que representan los movimientos verticales registrados simultáneamente que los resultados obtenidos en la gráfica 5. En el día 1 se hace evidente la reducción de tal actividad en los 3 grupos de animales tratados con SSI, MFD y AMF los valores correspondientes fueron (639.75 ± 19.41) , (298.42 ± 15.17) y (1228.75 ± 21.46) pre; mientras que para la situación post-administración los valores correspondientes fueron (140.87 ± 13.03) , (111.14 ± 9.49) y (1019.62 ± 36.85) respectivamente. Nuevamente, de estos valores sólo los obtenidos para el grupo al que se le aplicó solución salina, mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.030$). Sin embargo, para el día 8 los resultados fueron un tanto diferentes, en primer lugar el grupo tratado con MFD, mostró un ligero incremento en el número de cuentas al pasar de (118.42 ± 10.83) pre a (189.85 ± 16.68) post-administración. Mientras que los grupos tratados con SSI y AMF, mostraron una reducción en tal actividad al pasar de (616.12 ± 22.59) y (1059.5 ± 28.16) pre a (103.0 ± 7.96) y (439.12 ± 16.96) post-administración respectivamente. Ningún valor fue estadísticamente significativo, aunque los valores mostrados por la aplicación de solución salina mostraron un valor de $p < 0.067$.

Movimientos horizontales: Apomorfina

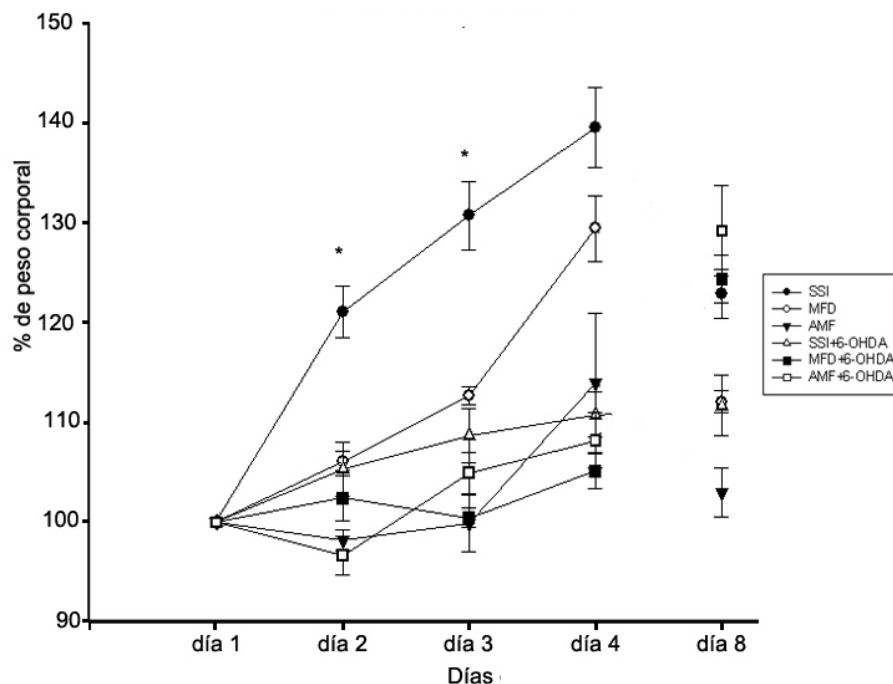


Gráfica 7.-En este grafico se observa el número de cuentas provocado por la actividad locomotriz que muestran los animales antes (pre) y después (post) de la aplicación del fármaco. Se muestran los resultados de los grupos tratados combinadamente con Apomorfina y Solución Salina Isotónica (SSI) ó Metilfenidato (MFD) ó Amfetamina (AMF). Durante la primera administración (día1) y durante la administración del día 8 (día 8) de este experimento. En el caso de los 3 grupos de animales SSI, MFD y AMF se muestra que durante el día 1 el promedio del número de cuentas previos a la administración fueron (11340.62± 200.84), (7395.5±148.45) y (8613.25±221.23), mientras que para la situación post-administración los valores correspondientes fueron de (7339.75±207.27), (4489.12±184.12) y (2860.12±94.98) respectivamente. Sólo los decrementos inducidos por la aplicación de la AMF mostraron un valor estadísticamente significativo ($p < 0.047$). Los datos mostrados por los animales que recibieron solución salina mostraron un valor de $p < 0.053$. En lo que respecta al día 8, el grupo experimental que mostró un incremento en el número de cuentas fue la AMF, el valor previo a la administración es de (6439.37±203.97), mientras que en la situación post-administración, este valor fue (9344.87±240.33); caso contrario ocurrió con los grupos de sujetos tratados con SSI y MFD, en estos grupos se observa una disminución en el número de cuentas que va de (5099.75±255.40) y (11921.12±312.11) pre a (4793.75±216.51) y (6247.12±322.80) post-administración respectivamente, valores que no son estadísticamente significativos. Cuando se

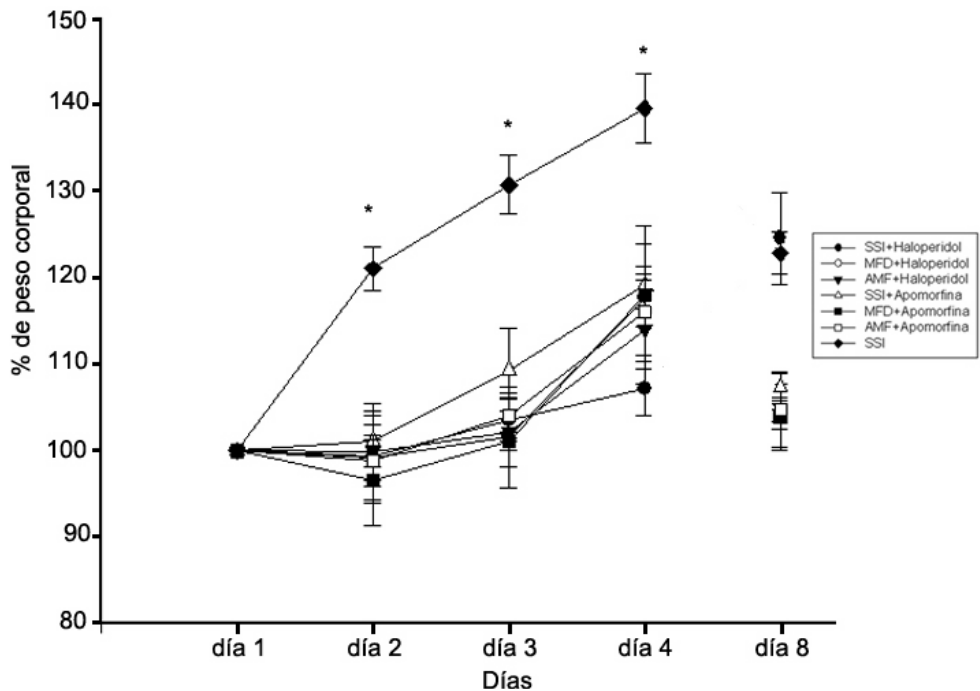
compararon los valores obtenidos con MFD y AMF en el día 1 con aquellos obtenidos en el día 8, se observa que los valores de la AMF si mostraron una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.033$.



Gráfica 8.-Esta gráfica muestra el promedio del número de cuentas, que representan los movimientos verticales registrados simultáneamente que los resultados obtenidos en la gráfica 7. En el día 1 se hace evidente la reducción de tal actividad en los 3 grupos de animales tratados con SSI, MFD y AMF los valores correspondientes fueron (543 ± 12.39) , (587.37 ± 15.12) y (731.12 ± 22.33) pre; mientras que para la situación post-administración los valores correspondientes fueron (443.12 ± 11.76) , (437.62 ± 17.47) y (84.0 ± 5.02) respectivamente. Solo el decremento mostrado por la aplicación de AMF fue estadísticamente significativo ($p < 0.030$). Sin embargo, para el día 8 los resultados fueron un tanto diferentes, en primer lugar el grupo tratado con AMF, mostró un incremento en el número de cuentas al pasar de (405.37 ± 15.37) pre a (498.0 ± 16.11) post-administración. Mientras que los grupos tratados con SSI y MFD, mostraron una ligera reducción en tal actividad al pasar de (107.37 ± 5.42) y (411.12 ± 20.92) pre a (62.12 ± 2.48) y (350.0 ± 16.22) post-administración respectivamente. Ninguno de estos valores fue estadísticamente significativo.



Gráfica 9.- Se muestran los porcentajes de peso corporal correspondiente a los grupos control y 6-OHDA, ambos fueron tratados con las 3 soluciones (SSI, MFD y AMF), se pesaban a los animales el primer día de registro y durante 3 días más consecutivos, en los cuales se inyectaban las soluciones, del día 5 al día 7, se evitaba la manipulación de los mismos hasta el día 8 donde se hacía el segundo registro. Se puede observar que los animales a los cuales se les administró únicamente SSI tienen una curva ponderal con un incremento del peso que es diferente estadísticamente con respecto a todos los otros grupos tratados. Esta diferencia se hace más notable en el día 2, Por ejemplo cuando se comparan los grupos controles con aquellos tratados con AMF la diferencia tiene una hipótesis nula con una probabilidad de $p < 0.019$, de igual forma ocurre cuando se compara SSI con MFD, el aumento de peso en los animales de SSI es significativo estadísticamente ($p < 0.024$), mismo caso ocurre al comparar los animales tratados previamente con 6-hidroxidopamina y posteriormente con MFD y AMF, los primeros tienen un aumento de peso significativo estadísticamente ($p < 0.026$) con respecto a los segundos. Las diferencias en cuanto al incremento en la curva ponderal por parte del grupo tratado con SSI, como se observa es muy notable gráficamente.



Gráfica 10.- se muestran los porcentajes de peso corporal correspondiente a los grupos de animales tratados con terapia combinada Apomorfina ó Haloperidol + (SSI, MFD, AMF). Se compararon estos grupos con el grupo tratado exclusivamente con SSI. Se observa que el incremento en la curva ponderal del grupo control tratado únicamente con SSI es estadísticamente significativo ($p < 0.020$) en comparación con el grupo tratado con MFD+Haloperidol, los cuales tuvieron sólo un pequeño incremento en el peso corporal. Lo mismo ocurrió cuando se compara estadísticamente al grupo SSI contra el grupo tratado con AMF+Haloperidol, en este caso existe una diferencia significativa de $p < 0.019$. Mientras que por otro lado, al comparar el grupo control de SSI con el grupo tratado con MFD+Apomorfina, la probabilidad de que sean iguales es de $p < 0.020$. Finalmente para el caso de la comparación entre el grupo control que recibió SSI con el grupo tratado con AMF + Apomorfina mostró una diferencia estadística de $p < 0.018$.

Discusión:

Los psicoestimulantes (cocaína, anfetaminas, metilfenidato) son fármacos cuyos principales efectos son, entre otros, potenciar el estado de vigilia, incrementar la resistencia física, desinhibir la conducta, incrementar la respuesta sexual, evitar la somnolencia, bajar de peso y generar una sensación de bienestar. Todos estos efectos son consecuencia de su acción en diversas estructuras del sistema nervioso central, y aunque sus efectos son similares, existen diferencias sutiles entre ellos, las cuales pueden además depender de la dosis administrada. Así, en términos generales, los psicoestimulantes bloquean la recaptura de noradrenalina (NA) y dopamina (DA), con lo que aumentan de manera significativa los niveles extracelulares de estos neurotransmisores ampliamente distribuidos en todo el cerebro³⁴. Algunos estimulantes como la AMF, estimulan también activamente la salida de DA de las células, acción que se debe a una inversión de la acción del transportador de DA²⁶. La AMF también puede estimular la salida de NA de las células, aunque esto solamente ocurre a dosis altas³. También en dosis altas, la AMF puede bloquear la recaptura de serotonina; lo que provoca una activación de la conducta²⁴. A diferencia de lo que sucede con la AMF, el MFD actúa tan solo bloqueando la recaptura de NA y DA, sin inhibir la recaptura de serotonina ni estimular la salida de NA o de DA²⁵.

La exposición repetida a psicoestimulantes induce un aumento progresivo de la actividad motora en numerosas especies, incluido el ser humano. Este fenómeno se denomina ‘sensibilización conductual’, y se asocia a cambios plásticos en circuitos nerviosos que, por otra parte, incrementan el valor motivacional de las drogas y además subyacen al fenómeno de un deseo inminente de ingerir la droga una vez que se abandona el consumo⁶. En Modelos experimentales, la dependencia a los psicoestimulantes se manifiesta por fenómenos neurobiológicos como son la sensibilización y la tolerancia.

Estos cambios plásticos neuronales son motivo de intenso estudio. El proceso adictivo consta de una fase de inducción, durante el consumo inicial de la droga, y otra de expresión, durante la consolidación de la adicción. Ambos fenómenos constan de mecanismos neuroquímicos y moleculares diferentes. En la inducción participa de modo crítico el circuito meso-cortico-límbico, y en ella se establecen cambios bioquímicos que fundamentan la sensibilización y facilitan el aprendizaje adictivo. En la expresión, destaca el sistema cortico

estriato-amigdalino, y en esta fase se desarrollan los cambios bioquímicos que generan el hábito adictivo, como conducta patológica consolidada. Además, se consolida la sensibilización y también aparecen fenómenos de tolerancia.

El incremento de la transmisión dopaminérgica en el circuito meso-cortico-límbico, que nace en el área ventral tegmental (AVT) y se dirige a áreas límbico-motoras, se asocia claramente con la sensibilización a psicoestimulantes, tanto durante la fase de inducción como la de expresión²³. Sin embargo, el proceso sensibilizador es más complejo que el simple cambio en una vía de neurotransmisión, y los resultados de cientos de experimentos indican que la sensibilización se debe a la interacción de diversos neurotransmisores, neuropéptidos, factores neurotróficos, sus receptores y sus vías de señalización intracelular. Hasta la fecha, la interacción entre dopamina y glutamato en el área ventral tegmental durante la fase de inducción a la Sensibilización ha sido la más estudiada.

La porción ventral del estriado (núcleo accumbens), desempeña un papel crítico en los cambios adaptativos al consumo crónico de droga que llevan a la adicción. La inicial actividad dopaminérgica aumentada desde el AVT sobre el núcleo accumbens facilitaría la formación de un tipo de aprendizaje que caracteriza a la adicción, el cual se consolidaría en forma de hábito en el estriado. Estos hechos se relacionan también con la sensibilización dopaminérgica mantenida⁸ y con la aparición de hipersensibilidad de receptores D₁ en el núcleo accumbens tras la administración crónica de psicoestimulantes. El aumento de sensibilización locomotora por hipersensibilidad D₁ se demuestra porque los ratones mutantes (knock out) sin receptores D₁ no denotan un incremento progresivo de la locomoción (es decir sensibilización) tras el tratamiento repetido con cocaína³⁶.

Los receptores D₃ en el núcleo accumbens también se sensibilizan tras la administración de psicoestimulantes como la cocaína. Se cree que la acción dopaminérgica (a través de receptores D₁ y D₃) facilita el establecimiento de circuitos neuronales estables o engramas en el núcleo accumbens, pues la DA ‘da paso’ a la acción glutamatérgica desde la corteza prefrontal y la amígdala basolateral sobre las neuronas del núcleo accumbens (y probablemente desde el hipocampo), activándolas y manteniéndolas en estado de alta actividad¹¹. La formación de nuevos engramas neuronales es un requisito para el establecimiento de la ‘motivación’ de búsqueda de la droga (desempeñando un papel crítico el núcleo accumbens), así como de hábitos motores anormales. La hiperactividad dopaminérgica en el estriado, se asocia a una

mayor síntesis y liberación de DA en las terminales mesolímbicas y nigroestriatales. Lo que provocará una fosforilación de proteínas como tirosinhidroxilasa y sinapsina I a través del incremento de calcio intra-citoplásmico y de las vías de cinasa como la calmodulina proteincinasa II (CaMK II) y la proteincinasa C (PKC)¹¹. De este modo, el consumo continuo de la droga establece circuitos motores estables o engramas probablemente diseñados para el aprendizaje del consumo³. El uso compulsivo de la droga se caracteriza por ser una conducta inflexible de hábito que persiste y se estimula fácilmente por estímulos asociados al consumo⁶. Una hipótesis establece que, una vez se consolidan las actividades neuronales del circuito cortico-estriato-amigdalino que participan en el aprendizaje de consumo de la droga (incluyendo aspectos cognitivos de recompensa), se generaría una espiral en el estriado de tal modo que se ‘transfiere’ la información a la corteza prefrontal y se consolidan circuitos de hábito motor muy estables. Los mecanismos moleculares y los sistemas dopaminérgicos involucrados, sobre todo en relación con el MFD, no se conocen con precisión; sin embargo, en todo este proceso, la sensibilización dopaminérgica mantenida sería fundamental. A este respecto se ha observado que la expresión del transportador de dopamina aumenta en el núcleo accumbens en la transición del estado agudo al crónico de administración de cocaína, lo que podría ser un marcador de la transferencia de información entre el estriado ventral y la corteza prefrontal, es de suponerse que el MFD mostraría una acción similar²⁷.

Los resultados del presente estudio, muestran la necesidad de la integridad de los sistemas dopaminérgicos para la expresión conductual de la sensibilización al MFD. Como se observa en la Gráfica 1, la administración del MFD en el día 1 provocó un incremento en el número de cuentas al pasar de 3117 a 5017 en promedio (un incremento del 60.95%), cuando este experimento se repitió en el día 8, después de la aplicación de esta dosis durante 4 días y después de un periodo de abstinencia de 3 días, el MFD incremento ahora la actividad al pasar de 4875 a 8080 en promedio (un incremento del 65.74%, $p < 0.022$), al comparar el incremento del día 1 con el del día 8, se observó que estos incrementos fueron estadísticamente significativos ($p < 0.03$) lo que significa que en este modelo el MFD induce un estado de sensibilización. En el caso de la amfetamina, la situación fue diferente, en el día 1 la aplicación de 2mg/Kg de amfetamina provocó una disminución de la actividad locomotriz, aunque en forma no significativa; mientras que en el día 8 el efecto fue un ligero incremento de la actividad. Sin embargo, si se comparan los valores del día 1 con los del día 8, encontramos que

hay una diferencia estadística importante ($p < 0.0004$)

Contrariamente, cuando los animales fueron pre-tratados con 6-OHDA, también conocida como oxidopamina, una neurotoxina que es capturada por los transportadores de DA y norepinefrina, y una vez intracelularmente forma compuestos radicales libres (como el radical superóxido), los cuales destruyen neuronas catecolaminérgicas¹⁵, los resultados fueron muy diferentes. La aplicación de MFD, provocó solo un ligero decremento no significativo en la actividad locomotriz (grafica 3). Una tendencia similar ocurrió en el día 8, donde el MFD sólo provocó un ligero decremento de esta actividad, y aunque hubo diferencias en cuanto a los valores observados el día 1 con respecto al día 8, éstos no fueron estadísticamente significativos (Grafica 3). En el caso de la AMF, también se observó un ligero incremento no significativo en el día 1, mientras que en el día 8, similarmente sólo se observó un leve decremento no significativo de la actividad locomotriz. Sin embargo, cuando se comparó el resultado de la aplicación de AMF del día 1 con aquel obtenido en el día 8, se observó una diferencia estadística importante ($p < 0.012$), lo cual significa que en estas ratas la AMF causa sensibilización, en otras palabras la 6-OHDA no bloqueó el desarrollo de la sensibilización inducida por la AMF. Efectos similares fueron encontrados en ratas sensibilizadas a la AMF pero en estructuras como en el AVT⁶⁵.

En el siguiente experimento, los animales experimentales recibieron una aplicación de haloperidol, el cual es un agente bloqueador no específico de receptores dopaminérgicos, con mayor afinidad que la DA en receptores D₂, lo que le da la característica de ser un fármaco neuroléptico⁶⁶. La aplicación de haloperidol fue local, es decir se hizo directamente sobre el núcleo accumbens a través de cánulas implantadas previamente cuya punta residía en el núcleo, con verificación postmortem en cortes histológicos del cerebro. De hecho si las cánulas, no se localizaban en la inmediación del núcleo, el animal era excluido del grupo experimental. Esta aplicación se realizó 5 minutos antes de la aplicación i.p. de MFD o de AMF. Este proceso se realizaba después del primer registro de 60 minutos en el día 1 y en el día 8. Se mostró que los efectos estimuladores del MFD desaparecieron casi completamente (Grafica 5), tanto en el día 1 como en el día 8, consecuentemente la diferencia entre los efectos inducidos por el MFD en el día 1 con aquellos provocados en el día 8, es inexistente ($p < 0.4$), lo que significa que existe un bloqueo completo del proceso de sensibilización observado en los animales controles. En el caso de la AMF, tanto en el día 1 como en el día 8, la aplicación del haloperidol conjuntamente

con la AMF, aun que por diferente vía, reduce la actividad motora. Aunque ambos decrementos no son significativos estadísticamente, este decremento si es importante (Grafica 5). Además, el número de cuentas observada después de la aplicación en el día 1 es menor que la observada en el día 8 (de 4449.5 del día 1 a 8591.25 en el día 8, un incremento del 93%), aunque es necesario mencionar que este incremento no fue significativo de forma estadística ($p < 0.16$). La razón puede ser el tamaño de la muestra y la alta variabilidad que muestran los sujetos en lo que respecta a su actividad locomotriz, además del tipo de prueba estadística empleada. A pesar de ello, consideramos que es posible afirmar que estos sujetos si presentaron un fenómeno de sensibilización, lo que sugiere que el haloperidol no bloquea tal efecto. En este grupo la única diferencia estadística ($p < 0.023$) la mostró el grupo control en la cual si se aplicó el haloperidol intracerebral pero seguido de la aplicación de solución salina isotónica intraperitoneal. Por lo tanto este efecto que sólo se observó en el día 1, muestra el efecto puro del haloperidol, el cual al ser un neuroléptico provoca sedación y reducción de la actividad locomotriz, exclusivamente cuando se aplica por vía sistémica, donde ejerce efectos prácticamente en todos los sistemas dopaminérgicos, particularmente en el sistema nigroestriatal e hipotalámico⁶⁷. En este caso, al hacer una aplicación, intra-accumbens sólo se afecto la actividad locomotriz, sin datos de sedación sin ningún otro efecto sistémico. En resumen, este grupo experimental nos mostró que el haloperidol es un bloqueador no específico o muy selectivo de los receptores a DA, particularmente los tipos D₁, D₂ y D₃, localizados en el núcleo accumbens, bloquea la sensibilización al MFD, sin afectar significativamente la sensibilización a la AMF (Grafica 5).

La apomorfina es un derivado sintético de la morfina, muy utilizado en experimentación como prototipo de agonista dopaminérgico. Tiene gran afinidad por los receptores dopaminérgicos D₄; afinidad moderada por D₂, D₃, D₅ y los receptores adrenérgicos $\alpha 1D$, $\alpha 2B$ y $\alpha 2C$, y poca afinidad por los receptores D₁. Como tiene alta afinidad por los autorreceptores presinápticos, inicialmente puede producir sedación, y luego ejerce la acción terapéutica sobre el temblor y la rigidez. El mecanismo preciso de acción de la apomorfina como tratamiento para la enfermedad de Parkinson es desconocido, aunque se cree que es debido a la estimulación de los receptores post-sinápticos de tipo D₂ de la dopamina en el cerebro⁶⁸. Sin embargo su principal blanco en el núcleo accumbens son los receptores presinápticos por lo que su efecto inicial, que sería el observado en este estudio, es una reducción en la liberación de DA y posteriormente sería la estimulación de los receptores postsinápticos, sobre todo de tipo

D1⁶⁹. En nuestro experimento la apomorfina, aplicada localmente en el accumbens e inmediatamente antes que el MFD y la AMF en el día 1 y el día 8 provocó una reducción de la actividad locomotora en todos los grupos, a excepción de la aplicación de AMF en el día 8 (grafica 7). Con el MFD, la reducción que se presenta en el día 1 y en el día 8 es casi significativa estadísticamente ($p < 0.06$) para el día 1, aunque esta acción ya no se muestra el día 8 ($p < 0.470$). Mientras que para la AMF, el decremento que se observa en el día 1 si es estadísticamente significativo ($p < 0.047$), pero el incremento observado el día 8 no lo es ($p < 0.351$). Además, el cambio observado tras la aplicación de MFD en el día 1 con respecto al día 8, fue menor y por supuesto no estadísticamente significativo ($p < 0.26$), mientras que la AMF si mostró un incremento significativo ($p < 0.033$) entre el valor registrado el día 1 con aquel registrado el día 8, en otras palabras, se siguió manteniendo el proceso de sensibilización a la AMF, mientras que el proceso de sensibilización al MFD se redujo considerablemente.

Conclusiones

Estos resultados muestran claramente que los mecanismos dopaminérgicos empleados por los psicoestimulantes del tipo del MFD y de la AMF son diferentes para desarrollar el fenómeno de la sensibilización. La alteración de la actividad dopaminérgica provocada por la aplicación de los tres fármacos empleados, 6-OHDA, haloperidol y apomorfina, redujeron significativamente los procesos de sensibilización al MFD y ejercieron efectos menores en el proceso de la AMF (Graficas 3,5 y 7). Tales diferencias pueden ser debidas a diferencias en el mecanismo de acción, el MFD es un fármaco que muestra una alta selectividad por el transportador de DA, mientras que la amfetamina ejerce otras acciones, además del bloqueo, en estas mismas neuronas dopaminérgicas, como sería la reversión de la función del transportador⁷⁰. A nivel conductual tales diferencias podrían explicar la mayor adicción que se observa en los abusadores de AMF, comparada con los sujetos que ingieren MFD por motivos recreacionales, así como la rapidez con que se manifiestan los efectos eufóricos de la ingesta de AMF, comparada con aquella que manifiestan los sujetos que ingieren MFD. Obviamente, es necesario describir los efectos de ambos fármacos en los procesos subsecuentes al dopaminérgico, como sería las acciones en las neuronas glutamatérgicas, ya que se ha comprobado que estas neuronas muestran los cambios plásticos característicos de las

adicciones, como sería la expresión de receptores tipo NMDA y AMPA glutamatérgicos alterada⁷¹. Experimentos que están siendo realizados en nuestro laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alfonso Pérez, José P. y colaboradores (2011). Neurociencia y adicción. Sociedad Española de Toxicomanías. 424 págs.
2. Bayer KU, De KP, Leonard AS, Hell JW, Schulman H. (2001) interaction with the NMDA receptor locks CaMII in an active conformation. *Nature* 411: 801-5
3. Berke JD, Hyman SE.(2000) addiction, dopamine and the molecular mechanism of memory. *Neuron* 25: 515-32 pág.
4. Carlezon WA, Boundy VA, Haile CN, Lane SB, Kalb RG, Neve RL, et al.(1997) sensitization to morphine and induced by viral-mediated gene transfer. *Science* 277: 812-4 pág.
5. Castroviejo-Pascual Igancio (2011) Síndrome del déficit de atención-Hiperactividad. 4ª ed. Ed. Diaz de Santos pág. 144-147
6. Childress AR, Ehrman R, Roohsenow DJ, Robbins SJ, O'Brien CP. (1992)Classically conditioned factors in drug dependence. In subman RB, Langard JG, eds. *Substance abuse.*, Baltimore: Williams and W, Ikins pág.56-69
7. Cooper JR, Bloom Fe, Roth RH. (1996)The biochemical basis of neuropharmacology. 7th Ed. New York/Oxford, Oxford University Press. pág. 293-351
8. Dalley JW, Thomas KL, Howes SR, Tsai TH, Aparicio-Legarza ML, Reynolds GP, et al. (1999) Effects of escitotoxic lesions of the rat prefrontal cortex on CREB regulation and presynaptic markers of the dopamine and amino acid function in the nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 11: 1265-74
9. Di Chiara G, Imperato A.(1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5274-8
10. Escobar I. Martha. *Sistema Nervioso*. Ed Universidad del Valle pág.49
11. Fernández-Espejo E. (2002) Bases Neurobiológicas de la drogadicción. *Rev Neurol* 34: 659-65

12. Florin SM, Kuczenski R, Segal DS. (1994) Regional extracellular norepinephrine responses to amphetamine and cocaine and effects of clonidine pretreatment. *Brain Res.* 654: 53-62.
13. Gold Frank LR, Hoffman RS. The cardiovascular effects of cocaine. *Ann Emerg Med* 20: 165-175.
14. Gold, M.S. Cocaine (and crack). Clinical aspects. In: Lowinson, J.H., ed *substance Abuse: A Comprehensive Textbook*, 3ª edición, Baltimore. Williams y Wilkins pp. 181-198
15. Gómora JC, Ávila G, Cota G. (1996) Ca^{2+} current expression in pituitary melanotrophs of neonatal rats and its regulation by D2 dopamine receptors. *J Physiol* 492: 763-73
16. Henry DJ, Xu XT, White FJ. (1998) Adaptions in the meso-accumbens dopamine system resulting from repeat administration of Dopamine D1 and D2 receptor-selective agonist: reliance to cocaine sensitization. *Psychopharmacology.* 140: 233-42.
17. Instituto de la Memoria, Depresión y Enfermedades de Riesgo SAC. IMDER. Trastorno por Déficit de Atención c/s Hiperactividad. [en línea] 2003-2013 [02 de octubre de 2013]. Disponible en la web: <http://www.institutodelamemoria.com/articulos-medicos/deficit-de-atencion-hiperactividad.html>
18. Iwata SI, Hewlett GHK, Ferell ST, Kantor L, Gnegy ME. (1997) Enhanced dopamine release and phosphorylation of synapsin and neuromodulin in striatal synaptosomes after repeated amphetamine, *J Pharmacol Exp Ther* 283:1445-52
19. Jackson DM, Westlind-Danielsson A. (1994) dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol Ther* 64:291-369
20. Jones SW. (1998) Overview of voltage-dependent calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 30:299-312
21. Kalivas P. W. (1995) interaction between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants. *Drug Alcohol Depend*, 37, 95-100.
22. Kalivas PW, Duffy P, Mackler SA. (1999) Interrupted expression of Nac-I augments the behavioral responses to cocaine. *Synapse* 33:153-9
23. Kalivas PW, Stewart J. (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Rev* 16: 223-44.
24. Kuczenski R, Segal DS, Cho AK, Melega W. (1995) Hippocampus norepinephrine,

- caudate dopamine and serotonin, and behavioral responses to the stereoisomers of amphetamine and methamphetamine. *J Neurosci.* 15:1308-17.
25. Kuczenski R, Segal DS. (1997) Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: Comparison with amphetamine. *J Neurochem.* 68:2032-7.
 26. Kuczenski R, Segal DS. (1999) *Neurochemistry of amphetamine.* Elsevier pág. 81-113
 27. Letchwarth SR, Nader MA, Smith HR, Friedman DP, Porrino LJ. (2001) Progression of changes in dopamine transporter binding site density as a result of cocaine self-administration in Rhesus monkeys. *J Neurosci* 21:2799-807
 28. Lewis B, O'Donnell P. (2000) Ventral tegmental area afferents to the prefrontal cortex maintain membrane potential "up" states in pyramidal neurons via D1 dopamine receptors *cereb Cortex* 10: 1168-75
 29. Licata SC, Pierce RC, (2003) the roles of calcium/ calmodulina-dependent and Ras/mitogen-activated protein kinases in the development of psychostimulant-induced behavioral sensibilization. *J Neurochem* 85: 14-22
 30. Lledo PM, Homburger V, Bockaert J, Vincent J-D. (1992) Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptor to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron* 8: 455-63
 31. Lorenzo, P. (1998) MDMA y otras feniletilaminas. *Farmacología y toxicología general.*
 32. Luque Villero Sonia y cols (2010) *Guía práctica de diagnóstico y manejo clínico del TDAH en niños y Adolescentes para profesionales.*
 33. Meana. J.J, Barturen, F. (1995) *psicoestimulantes: cocaína, amfetaminas y xantinas.* Instituto Deusto de Drogodependencias. Bilbao
 34. Mehta MA, Sahakian BJ, Robbins TW. Comparative psychopharmacology of methylphenidate and related drugs in human volunteers, patients with ADHD, and experimental animals. *Pàg.*303-31.
 35. Missale C, Russel NS, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. (1998) dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* Tomo78; pág. 189-225
 36. Moratalla R, Xu M, Tonegawa S, Graybiel AM. (1996) Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14928-33

37. Mueller PD, Benowitz NL, Olson KR (1990) Cocaine. *Emerg Med Clin North Am.* tomo 8; pág 481-493
38. Nestler EJ. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* tomo2; pág119-98
39. Nestler EJ, Terwilliger RZ, Walker JR, Sevarino KA, Duman RS. (1990) Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits $G_{i\alpha}$ and $G_{o\alpha}$ in discrete regions of the brain. *J Neurochem.* Tomo 55; pág 1079-82
40. Pearsons L.H. Justice J.B. (1993) Serotonin and dopamine sensitization in the nucleus accumbens, ventral tegmental area and dorsal raphe nucleus following repeated cocaine administration. *J Neurochem* tomo 61; pág 1611-9
41. Pierce RC, Kalivas PW. (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Rev* tomo25; pág192-216
42. Pierce RL, Born B, Adams M, Kalivas PW. (1996) Repeated intra-ventral tegmental area administration of SKF-38393 induces behavioral and neurochemical sensitization to a subsequent cocaine challenge. *J Pharmacol Exp Ther.* Tomo 278; pág 384-92
43. Pineda Ortíz, J. Torrecilla-Sesma, M (1999). Mecanismos neurobiológicos de la adicción a drogas. *Trastornos adictivos.* tomo1; pág 13-21.
44. Poncer JC, Esteban JA, Malinow R. (2002) Multiple mechanism for the potentiation of AMPA receptor-mediated transmission by α - Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci* tomo 22; pág 4406-11
45. Quintero J., Navas M., Fernández A., Ortíz T. (2009) avances en el trastorno por déficit de atención e hiperactividad ¿Qué nos aporta la Neuroimagen? *Actas Esp Psiquiatr* tomo 37(6); pág 352-358.
46. Rivas Navarro Manuel. *Procesos Cognitivos y Aprendizaje Significativo.* Ed Consejería de Educación. Madrid. pág 327.
47. Robbins TW, Everitt BJ. (1999) Drug addiction-bad habits and up. *Nature.* Tomo 398; pág 567-70
48. Robinson TE, Berridge KC. (1993) The neural basis of drug craving an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev.* tomo 18; pág 247-91

49. Robinson TE, Berridge KC. (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction*. Tomo 95; pág 91-117
50. Robinson TE, Berridge KC. (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction*; tomo 95:pág 91-117.
51. Rosencranz JA, Grace AA. (2001) Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *J Neurosci* tomo 21; pág 4090-1013
52. Sallés J, Dierssen M. Neurobiología del abuso de amfetaminas y sustancias derivadas. En Meana JJ y Barturen eds. *Psicoestimulantes: cocaína, amfetaminas y xantinas*. Bilbao. Universidad de Deusto. Pág. 47-85.
53. San, L. (1993) Dependencia de amfetaminas. En casa, M. Gutierrez, M; San, L. *Adicción a psicofármacos*. Citran. Barcelona pág 261-281
54. Sánchez Ramírez Manuel S. (2008) *Drogas de Abuso*. pág 2-21
55. Seeman P, VanTol HHM. (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* tomo 15; pág 264-70
56. Soutullo Esperón César (2007). *Manual de diagnóstico y tratamiento del TDAH*. Ed. Médica Panamericana pág 71
57. Stephenson CP, Hunt GE, Topple AN, McGregor IS. (1999) The distribution of 3,4-metylenedioxymethamphetamine “ecstasy”-induced c-fos expression in rat brain. *Neuroscience*. Tomo 92; pág 1011-23
58. Stewart J, Vezina P. (1989) micro injections of SCH-23390 into the ventral tegmental area and substantia nigra pars reticulata attenuate the development of sensitization to the locomotor activating effects of systemic amphetamine. *Brain Res*. tomo 495; pág 407-6
59. Vezina P. D. (1996) Dopamine receptor activation is necessary for the induction of sensitization by amphetamine in the ventral tegmental area. *J Neurosci*. Tomo 16; pág 2411-20
60. Walter G Bradley, Daroff B. Robert, Fenichel I.M. Gerald, Jankovic Joseph. *Neurología Clínica. Diagnóstico y Tratamiento*. 4ª ed. Ed. Elsevier. Madrid. pág 119

61. Wang, J. Q.; McGinty, J. F.(1995) Diferential effects of D1 and D2 dopamine receptor antagonists on acute amphetamine or metamphetamine e induced up regulation of zif/268 mRNA expression in rat.
62. Watling KJ, Keabian JW, Neumeyer JL. (1995) RBI handbook of receptor classification and signal transduction. Research Biochemicals International
63. Weiner N, Molinoff PB. (1989) Catecolamines. En: Siegel GJ, Agranoff B, Albers RW, Molinoff PB eds. Basic Neurochemistry. 4th Ed. New York; Raven Press; pág 233-51
64. Wolf ME, Xue CJ. (1999) Amphetamine-induced glutamate efflux in the rat ventral tegmental area is prevented by MK-801, SCH-23390, and ibotenic acid lesions of the prefrontal cortex. J Neurochem; tomo 73: pág 1529-38.
65. Bardo MT, Robinet PM, Mattingly BA, Margulies JE. (2001)Effect of 6-hydroxydopamine or repeated amphetamine treatment on mesencephalic mRNA levels for AMPA glutamate receptor subunits in the rat. Neurosci Lett. Apr 20;302(2-3):133-6.
66. Seeman P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. Can J Psychiatry. (2002) Feb;47(1):27-38.
67. Fink-Jensen A. (2000) Novel pharmacological approaches to the treatment of schizophrenia Dan Med Bull. Jun;47(3):151-67.
68. San Luciano M, Saunders-Pullman R. (2009)Substance abuse and movement disorders. Curr Drug Abuse Rev. 2(3):273-8.
69. Stacy M, Silver D. (2008) Apomorphine for the acute treatment of "off" episodes in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 14(2):85-92.
70. Chiu VM, Schenk JO. (2012) Mechanism of action of methamphetamine within the catecholamine and serotonin areas of the central nervous system. Curr Drug Abuse Rev. Sep;5(3):227-42.
71. Pierce RC, Wolf ME. (2013) Psychostimulant-induced neuroadaptations in nucleus accumbens AMPA receptor transmission. Cold Spring Harb Perspect Med. Feb 1;3(2):a012021.