

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) suministradas por Iffa Credo (Lyon, Francia) con un peso comprendido entre 250-350 gramos. Adicionalmente, en algunos experimentos de electrofisiología presentados en el Trabajo 4, empleamos ratones macho de la cepa C57BL/6 de 10 a 12 semanas de edad (25-30 g; Iffa Credo, Lyon, Francia) y ratones mutantes nulos (KO) para el receptor 5-HT_{1A} (con el mismo fondo genético que los controles pero con una delección en la parte inicial del gen que incluye el codón de iniciación, por lo que el gen queda inactivado). Los ratones mutantes nulos se generaron en la Universidad de Princeton (EUA) por el grupo de Miklos Toth y sus características se detallan en Parks *et al.* (1998). A partir de esta fuente inicial se generó una colonia estable en el estabulario de la Universidad de Barcelona, de donde proceden los ratones utilizados en nuestros estudios.

Los animales se estabularon en jaulas en un ambiente controlado: ciclo de 12 horas de luz (7h-19h) y 12 h de oscuridad (19h-7h) y 22 ± 2 °C de temperatura. Los animales se alimentaron con piensos comerciales y tuvieron libre acceso a agua y comida durante el tiempo previo a su utilización. El cuidado y tratamiento de los animales se realizó siguiendo la legislación española en “Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos”, de acuerdo con las normas de la Unión Europea (O.J. de E.C. L358/1 18/12/1986).

1.2 Fármacos utilizados

En la Tabla 3 se detalla la actividad farmacológica de los fármacos que aparecen en los distintos Trabajos presentados:

Tabla 3. Fármacos utilizados y su actividad farmacológica.

Fármaco	Actividad	Fármaco	Actividad
BAY X 3702	Agonistas 5-HT _{1A} ^a	Cirazolina	Agonista α_1
8-OH-DPAT		Prazosín	Antagonista α_1
Buspirona		(+)-MK 801	Antagonista NMDA
Alnespirona		AMPA	Agonista AMPA/KA
Ipsapirona		NBQX	Antagonista AMPA/KA
WAY-100635	Antagonista 5-HT _{1A}	Picrotoxinina	Antagonistas GABA _A
DOI	Agonista 5-HT _{2A,2C}	Bicuculina	
M100907	Antagonista 5-HT _{2A}	LY-379268	Agonista mGluR II
Ritanserina	Antagonistas 5-HT _{2A/2C}	1S,3S-ACPD	Agonista mGluR II/III
Ketanserina		L-trans-PDC	Inhibidor recaptación de glutamato
Tropisetron	Antagonistas 5-HT ₃	TTX	Bloquea canales Na ⁺
Ondansetron		DAMGO	Agonista μ -opioide
Citalopram	ISRS	Ciclotiazida	Evita desensibilización AMPA
Fluoxetina		SB 242084	Antagonista 5-HT _{2C}

^a Ordenados de mayor a menor afinidad por el receptor 5-HT_{1A}

2. MÉTODOS

2.1 Microdiálisis en rata consciente o anestesiada

2.1.1 Fabricación e implante de sondas

La técnica de microdiálisis intracerebral se utiliza rutinariamente en nuestro laboratorio desde hace bastantes años. Podemos encontrar actualizados la metodología utilizada para la fabricación de las sondas de microdiálisis así como el procedimiento de su implante en el cerebro del animal en Adell y Artigas (1998). Durante la operación de implante de sondas los animales se anestesiaron con

pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p). En la figura 12 se presenta un esquema de una sonda de microdiálisis detallando cada uno de sus componentes.

La Tabla 4 muestra las coordenadas estereotáxicas, tomadas respecto a bregma, del lugar del implante y la longitud de la superficie activa de las membranas de diálisis escogida para el muestreo de la zona diana.

	Longitud	AP	L	DV
CPFm	4	+3.4	-0.8	-6.0
MD+CM	1.5	-3.2-3.6	-0.5-0.7	-6.5
NRD	1.5	-7.8	-3.1	-7.5 ^a

Tabla 4. Coordenadas de implante de las sondas de microdiálisis (atlas de Paxinos y Watson, 1986) y longitud de la membrana de diálisis utilizada. ^a Las sondas se implantaron con un ángulo de 30° para evitar la obstrucción del acueducto. Todos los valores se expresan en mm.

2.1.2 Obtención de muestras por diálisis

La obtención de muestras se realizó a las 18-20 h después del implante de la sonda para permitir la recuperación del animal de la operación quirúrgica y la estabilización de los niveles basales de 5-HT (Kalén *et al.*, 1988b).

Se perfundió el sistema con líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial de la siguiente composición (en mM): NaCl, 125; KCl, 2.5, MgCl₂; 1.18; CaCl₂, 1.26, que da como resultado una solución con un pH de 6.5. La infusión de LCR se realizó mediante bombas de flujo variable. Durante el paso por la parte activa de la membrana se produjo la diálisis y la muestra obtenida se recogió en un vial de polietileno de 250 µl situado al final del tubo de salida.

Los primeros 10 minutos de perfusión fueron a un flujo de 10 µl/min con el fin de limpiar los tubos y conexiones de impurezas y establecer un equilibrio entre el LCR artificial y el tejido. A continuación el flujo se redujo a 1.5 µl/min y se dejó un periodo de 30-60 min de estabilización tras el cual se procedió a recoger las muestras cada 20 min, obteniéndose volúmenes de 30 µl/muestra.

Los niveles basales de 5-HT se recogieron en 6 fracciones de 20 min de las cuales se utilizaron 4 para calcular los valores basales. Las fracciones siguientes

correspondieron al efecto de los fármacos aplicados por vía sistémica o local mediante diálisis inversa.

La concentración de 5-HT en el espacio extracelular es muy baja porque el neurotransmisor se recapta por el transportador de 5-HT. En estas condiciones es muy difícil detectar pequeños cambios en la concentración de 5-HT porque están en el rango del ruido basal. Para superar este inconveniente en la mayoría de los experimentos se añadió al LCR el inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT citalopram a concentración muy baja (1 μ M). Los niveles del neurotransmisor en esas condiciones magnifican la liberación con respecto al equilibrio entre liberación y recaptación (Jackson y Abercrombie, 1992; Romero *et al.*, 1998).

Los animales a los que se les implantaron sondas o electrodos de estimulación en los núcleos MD y CM del tálamo fueron anestesiados con hidrato de cloral durante todo el experimento para simular las condiciones de los experimentos de electrofisiología. El implante de las sondas siguió el mismo procedimiento que en los animales a los que se dializó mientras estaban conscientes (anestesia inicial con pentobarbital sódico). El día posterior al implante se procedió a anestesarlas con hidrato de cloral (dosis inicial 400 mg/kg, i.p., y dosis adicionales de 80 mg/kg, i. v.).

2.1.3 Administración de fármacos

Los fármacos administrados por diálisis inversa a través de la sonda de diálisis se disolvieron en el LCR artificial, con o sin citalopram dependiendo de las condiciones y objetivos del experimento. Previamente a su utilización se comprobó el pH y se ajustó a 6.5-7 con NaHCO₃ cuando fue necesario. Los fármacos suministrados sistémicamente se disolvieron en salino al 0,9 % y se administraron i.p., s.c. y en animales anestesiados i.v. cuando fue necesario. Los fármacos se conservaron a – 80 °C, excepto aquellos cuya estabilidad no permite su congelación.

2.1.4 Análisis de las muestras

Las muestras de diálisis se analizaron mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el método de Adell y Artigas (1998). Se analizaron los niveles de 5-HT y de su metabolito 5-HIAA. La separación se realizó en una columna Beckman (San Ramon, CA, EUA) de 3 μ m de tamaño de partícula, una longitud de 75 mm y un diámetro de 4.6 mm.

La 5-HT y su metabolito 5-HIAA se cuantificaron mediante un detector electroquímico Hewlett Packard 1049 con un potencial de oxidación fijado a +0.6 V. El flujo de trabajo fue de 0.7 μ l/min. Los tiempos de retención para la 5-HT y el 5-HIAA variaron entre 3.5-4 min, siendo el límite de detección para la 5-HT de 2 fmoles. Los cromatogramas obtenidos se procesaron mediante un programa informático (Turbo Chrom 4.1, Perkin Elmer).

2.1.5 Verificación histológica

Una vez terminado el experimento se sacrificó a los animales mediante una sobredosis de anestesia. En los animales con sondas implantadas en la CPFm se pasó a través de las mismas una solución del colorante Fast Green (Sigma Chemical) con el fin de dejar una marca verde visible a lo largo de toda la zona en la que se ha producido diálisis. Tras unos minutos de espera se extrajo el cerebro y se congeló a -20 °C. Posteriormente se realizaron cortes coronales a los niveles adecuados mediante un bisturí hasta que se comprobó la localización de la marca dejada por la sonda.

Los animales con sondas implantadas en el tálamo (desinhibición del tálamo con bicuculina) fueron perfundidos tal y como se explica en los apartados de electrofisiología. Posteriormente se realizaron cortes de los cerebros mediante el vibrátomo.

2.1.6 Análisis estadístico

Los resultados del análisis de las muestras por HPLC se obtuvieron en forma de fmoles/fracción para la 5-HT y el 5-HIAA, y se expresaron en forma de % de efecto \pm EEM respecto el nivel basal (que es la media de cuatro fracciones previas a la

administración del fármaco). En ningún caso estos valores se corrigieron por el factor de recuperación de la membrana de diálisis.

Para analizar los resultados se utilizó el programa informático GraphPad Prism (versión 2.00, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

En los experimentos en los cuales se administró un fármaco a una única dosis o concentración, el análisis estadístico de los resultados se realizó a partir de los valores crudos mediante un test ANOVA de una vía para datos repetidos, seguido de un test de comparación de medias post-hoc. En estos casos se analizaron los factores tiempo y tratamiento. En aquellos experimentos en los cuales se aplicaron concentraciones crecientes de un fármaco o tratamientos distintos, los resultados se analizaron mediante ANOVA de dos vías para datos repetidos, siendo la variable independiente la dosis o el fármaco administrado y la dependiente el tiempo.

En todos los casos se utilizaron análisis estadísticos de 2 colas. El nivel de significancia se estableció con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$).

2.2 Electrofisiología en rata y ratón anestesiados

2.2.1 Anestesia

En todos los experimentos se utilizó hidrato de cloral diluido en salino al 0,9%. La dosis inicial de hidrato de cloral fue de 400 mg/kg administrado i.p. Una vez que el animal estuvo bajo los efectos de la anestesia se procedió a la canulación de la vena femoral. La dosis adicional necesaria para mantener al animal anestesiado fue de 80 mg/kg, que se administró i.v. El intervalo de administración de las dosis adicionales del anestésico varió entre los animales, pero típicamente fue entre 30 y 45 minutos.

2.2.2 Preparación de los animales para estereotaxia

El animal se colocó en un aparato de estereotaxia. Todos los puntos de contacto entre el animal y el estereotáxico fueron bañados con una solución analgésica de lidocaina clorhidrato al 5%. Con el objetivo de minimizar las pulsaciones producidas por el LCR se punzó la membrana atlanto-occipital mediante una aguja y se esperó a que drenara algo de LCR. La temperatura del animal se mantuvo constante a 37°

durante todo el experimento gracias a una manta termorreguladora (modelo RTM-1, Cibertec) situada entre el animal y el estereotáxico.

2.2.3 Preparación de electrodos

2.2.3.1 De registro

Los electrodos utilizados para registrar actividad eléctrica se fabricaron a partir de micropipetas de vidrio capilarizadas de 2.0 mm (Borosilicate glass capillaries, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA) que se estiraron con un estirador de vidrio ("puller", Narishige modelo PE-2, Narishige Scientific Instruments, Tokio, Japón). Posteriormente se rellenaron con cloruro sódico 2 M filtrado. La impedancia inicial de los electrodos fue de 15 a 20 M Ω , que se redujeron *in vitro* a unos valores comprendidos entre 4 y 10 M Ω . Este proceso se realizó pasando pulsos de corriente de 1-2 mA durante 500 ms en un circuito cerrado mediante hilos de plata sumergidos en una solución de salino (mediante un estimulador Grass S-48 conectado a una unidad de aislamiento del estímulo Grass SIU 5, Grass Medical Instruments, Massachusetts, EUA).

2.2.3.2 De estimulación

Los electrodos de estimulación se fabricaron a partir de electrodos bipolares de acero inoxidable recubiertos de un baño aislante (California Fine Wire Company, Grover Beach, California). Posteriormente se procedió a pelar con un bisturí las dos puntas (aproximadamente 400-600 μ m) y a separarlas unas 100-150 μ m.

La fijación de los electrodos de estimulación al cráneo del animal se realizó mediante una primera capa de pegamento de cianoacrilato (Super Glue-3 Gel, Loctite®) y una capa de resina autopolimerizante de metilo metacrilato (TAB 2000, Kerr®, Salerno, Italia) por encima.

Los estímulos fueron monofásicos cuadrados, típicamente de 0.2 ms, 0.5-2 mA y 0.9 Hz.

2.2.4 Fabricación de cánulas y sondas para la administración local de fármacos

En los experimentos de electrofisiología, además de cánulas utilizamos sondas de microdiálisis distintas a las empleadas habitualmente en el laboratorio con el objetivo de minimizar el tiempo en el que el fármaco llega a la zona diana de la administración. A continuación se detallan las características de ambas.

2.2.4.1 Preparación de cánulas

Se utilizaron cánulas en el Trabajo 2 para la administración local de DOI en CPFm de rata y en el Trabajo 3 para la administración de bicuculina en los núcleos mediodorsal (MD) y centromedial (CM) del tálamo de la rata. Las cánulas se construyeron de acero inoxidable de 32 g (Small Parts Inc., Miami, FL, EUA) unidos a una jeringa Hamilton de 10 μ l por un tubo de teflón. Se utilizaron bombas de microinfusión (Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN, EUA).

2.2.4.2 Preparación de sondas para electrofisiología

La diferencia fundamental entre las sondas modificadas y las sondas de microdiálisis convencionales es que el tubo de sílica (Polymicro Technologies; D.E. 0.11 mm y D.I. 0.04 mm) de entrada es mucho más largo, aproximadamente 40-50 cm. Dicho tubo está unido a un tubo de plástico de polietileno (Portex, Ltd.; D.E. 0.61 mm y D.I. 0.28 mm) de 1 cm, que directamente se une a un “interruptor de fluidos” (*switch*, CMA). El *switch* permite cambiar el tipo de fluido que entra en la sonda en cualquier momento del experimento: en la situación basal se infundió LCR artificial y en el momento de administrar el fármaco se giró el *switch* para que entrara en la sonda el LCR con el fármaco.

Teniendo en cuenta la longitud de los tubos y su diámetro interno se calculó, para cada experimento, la longitud que recorrería una burbuja de aire en el tubo de polietileno durante un minuto de administración a un flujo de 3 μ l/min, y esta observación experimental sirvió para asegurar que el fluido estaba entrando en la sonda al flujo correcto. Con estos datos también se pudo hacer una estimación del tiempo que tardaría el fármaco en llegar al tejido, que fue típicamente de 2-3 min. Un esquema de este tipo de sondas se detalla en la figura 12.

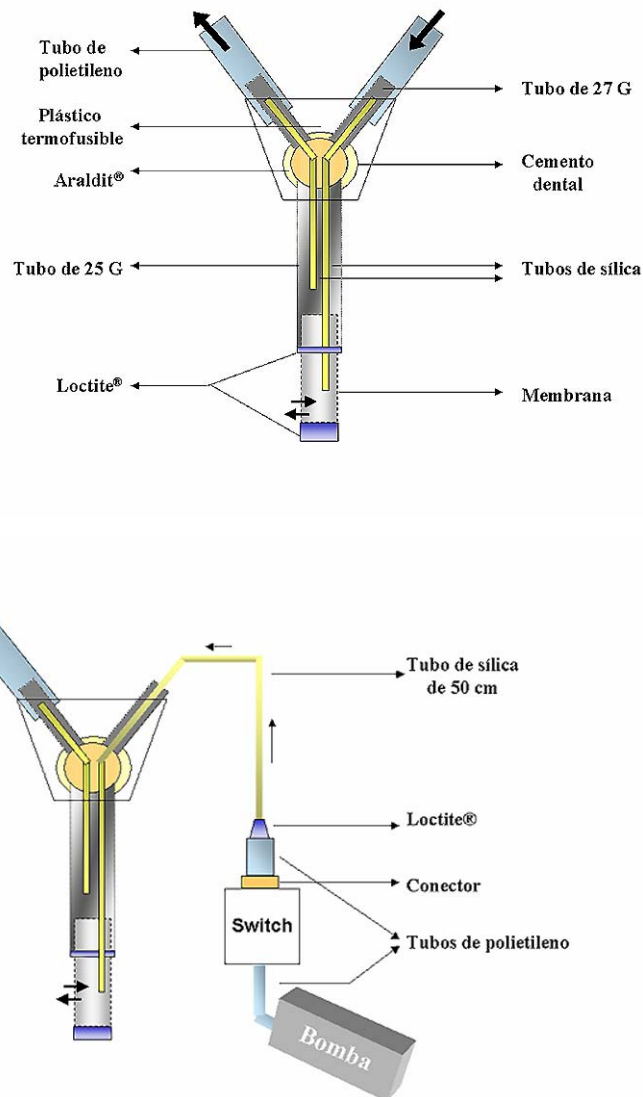


Figura 12. Esquema de una sonda de microdiálisis convencional (A) y de una sonda modificada para los experimentos de electrofisiología (B).

2.2.5 Registro uni-extracelular

2.2.5.1 Características del laboratorio

Una vez colocado el animal en el estereotáxico e implantados cánulas/sondas o electrodos de estimulación, se procede a introducir un electrodo de registro que se desciende dentro del cerebro del animal mediante un microposicionador hidráulico de avance y precisión micrométrica (modelo David Kopf 640).

El circuito inicial que recoge los potenciales de campo generados por los potenciales de acción de las neuronas registradas consiste en un hilo de plata introducido dentro del electrodo de registro y un electrodo de tierra colocado en el tejido muscular del cuello del animal, que van a la célula receptora de la señal eléctrica.

Brevemente, la señal eléctrica se amplifica en dos fases. Una primera que lo hace 10 veces a través de un amplificador (Neurodata IR283, Cygnus Technology Inc., Delaware Water Gap, EUA) y una segunda realizada por un post-amplificador que lo hace unas 50 veces más a la vez que filtra (Cibertec, Madrid). La señal obtenida inicialmente por el primer amplificador va a un osciloscopio (HM 305, HAMEG Instruments, Barcelona) que nos va a permitir observar la señal eléctrica original. Posteriormente a la post-amplificación y filtro, la señal se envía a un aparato de audio (Cibertec, Madrid) y a la interfase (DAT Micro1401, Cambridge Electronic Design, CED; Cambridge, Inglaterra). Finalmente, la interfase transforma la señal analógica en digital para que el programa Spike2 pueda adquirir los datos y almacenarlos en el ordenador.

Adicionalmente el equipo dispone de un estimulador Grass S-48 conectado a una unidad de aislamiento del estímulo Grass SIU 5 (Grass Medical Instruments).

El esquema del equipo de registro que se utilizó se presenta en la Figura 13.

2.2.5.2 Registro de neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe

Para el registro de neuronas serotoninérgicas utilizamos metodología descrita en la bibliografía (Sawyer *et al.*, 1985; Celada *et al.*, 1996). Se realizó un agujero de 4 x 4 mm sobre lambda (atlas de Paxinos y Watson, 1998) y posteriormente se ligó el seno sagital con seda trenzada, se cortó por la parte central y se apartó del centro de la ventana realizada para dejar paso al electrodo de registro. Los electrodos de registro se descendieron de 5 a 7 mm por debajo de la duramadre en las ratas y 2 a 3.5 mm en el caso de los ratones.

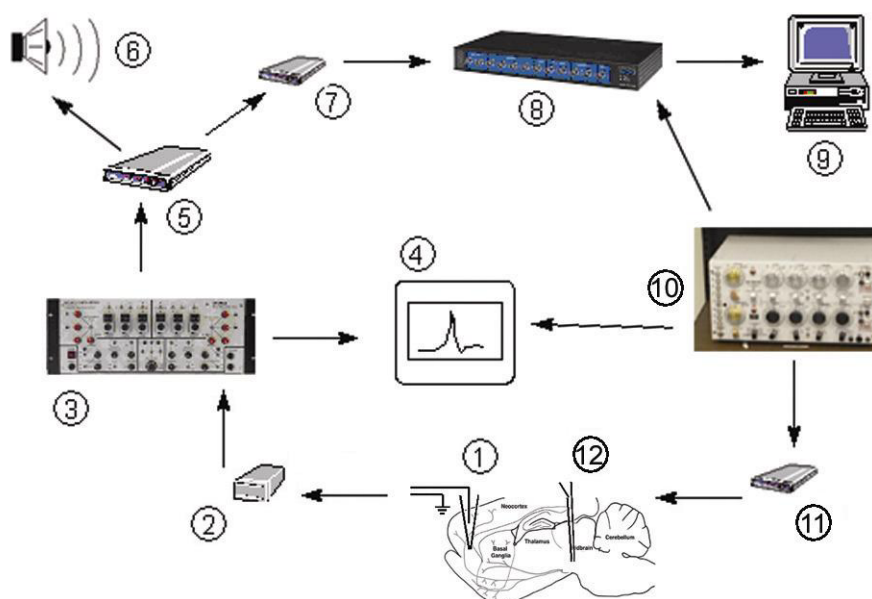


Figura 13. Esquema del equipo de registro de actividad eléctrica extracelular unitaria. La señal es recogida por el electrodo de registro (1), pasa por una célula receptora (2), se amplifica (3), se monitoriza en un osciloscopio (4), se post-amplifica y filtra (5), se transforma en una señal de audio (6), se limita mediante un limitador de corriente (7), se transforma en señal digital por una interfase (8) y se recoge en un ordenador (9) para su posterior análisis. Adicionalmente, se puede generar un estímulo eléctrico mediante un estimulador (10) que pasa por una unidad de aislamiento del estímulo (11) y envía el impulso eléctrico al electrodo de estimulación (12). Paralelamente, el estimulador envía la señal a la interfase (8) y al osciloscopio (4).

Los registros se realizaron cerca de la línea media, debido a que la mayoría de las células presentes en dicha zona son 5-HT (Aghajanian y Wang, 1977; Aghajanian, 1978).

Las neuronas serotoninérgicas se identificaron siguiendo los criterios descritos por Wang y Aghajanian (1977a): descarga espontánea regular a frecuencias comprendidas entre 0.3 y 3.4 Hz, y potenciales de acción bi- o trifásicos de 2 a 5 ms de duración. Las neuronas que no cumplían alguno de estos requisitos fueron descartadas del estudio. En algunos casos se confirmó el fenotipo de la neurona registrada farmacológicamente, mediante la reducción de su frecuencia de descarga por la administración i.v. de 8-OH-DPAT a dosis de 0.25-12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en rata y 2-32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en ratones.

En la Tabla 5 se muestran las coordenadas que se utilizaron para registrar neuronas 5-HT tanto en rata como en ratón.

Área de registro	AP	L	DV
NDR (rata)	-7.8	0	-5-7
NDR (ratón)	-4.6	0	-2-3.5
CPFm (neuronas piramidales)	+3.2+3.4	-0.5-1	-1.1-4.8
CPFm (interneuronas GABAérgicas) ^a	+3.2+3.4	-0.2-0.5	-1.1-3.6
MOs ^b	+3.2+3.4	-2-2.6	-0.8-1.4
Area de estimulación	AP	L	DV
NDR	-7.8	0	-6.5
	-7.8	-3.1	-6.8 ^c
	-7.3	-2.2	-6.2 ^c
NMR	-7.8	+2	-8.6 ^c
CPFm	+3.4	±0.5	5
ATV	-6.0	-0.5	-8.2
MD	-2.8	-0.5	-5.3

Tabla 5. Coordenadas de registro y estimulación en rata y ratón. ^a En el Trabajo 6 se intentó aumentar las posibilidades de registrar interneuronas GABAérgicas que expresaran en receptor 5-HT₃, por lo que las coordenadas de registro en CPFm fueron más mediales. ^b Estas coordenadas se dan según el Atlas de Swanson (1998). ^c Los electrodos de estimulación en estas áreas se implantaron con un ángulo lateral de 30°, 20° y 13°, respectivamente, para evitar dañar el seno venoso y, en los dos últimos casos, evitar problemas estéricos en los animales en los que se implantaron dos o tres electrodos a la vez. Todas las coordenadas están expresadas en mm.

2.2.5.3 Registro de neuronas piramidales y GABAérgicas de la corteza prefrontal medial (CPFm) y corteza frontal motora secundaria (MOs)

Para el registro de neuronas corticales se realizaron agujeros de aproximadamente 2 mm de diámetro con el taladro. Las coordenadas de las distintas áreas de registro utilizadas se muestran en la Tabla 5.

Las neuronas piramidales se identificaron sistemáticamente por a) activación antidrómica desde algún área de estimulación (que varían según los distintos trabajos: NDR, NMR, ATV y MD); y b) por colisión con potenciales de acción espontáneos. Esta metodología se describe en Fuller y Schlag (1976). Las neuronas sin activación antidrómica se descartaron como posibles neuronas piramidales. La media típica de frecuencia de descarga es aproximadamente 1.5 potenciales/s, aunque el rango es muy amplio (encontramos neuronas silentes a las que identificamos por activación antidrómica y neuronas muy despolarizadas – habitualmente de forma farmacológica- que pueden llegar a 20-25 potenciales/s).

Las interneuronas GABAérgicas de corteza son una población muy heterogénea. Tal y como se expone en la Introducción, existen distintas clasificaciones según su morfología, patrón de descarga y expresión de distintos neuropéptidos y proteínas de unión a calcio. En nuestro caso, para aumentar las posibilidades de registrar interneuronas GABAérgicas nos orientamos por el patrón de descarga y por que no presenten activación antidrómica desde ningún área que estamos estimulando eléctricamente.

La corteza MOs, a diferencia de la CPFm, no proyecta a los núcleos del rafe. Esto supone un inconveniente en el momento de identificar neuronas piramidales, ya que no podemos utilizar la antidromicidad como característica de las neuronas de proyección. Sin embargo, teniendo en cuenta el patrón de descarga y la proporción ~5 a 1 entre neuronas piramidales y GABAérgicas, tenemos más probabilidad de registrar una neurona piramidal que una GABAérgica.

2.2.6 Tratamientos con *p*-clorofenilalanina (PCPA)

La *p*-clorofenilalanina (PCPA) es un inhibidor del enzima TPH, que participa en la síntesis de 5-HT. Nuestros tratamientos consistieron en dos administraciones de 350 mg/kg i.p., 48 y 24 horas antes del experimento. El protocolo de detección de 5-HT en tejido fue el utilizado rutinariamente en el laboratorio y se describe en Adell *et al.* (1989).

Los niveles de 5-HT en tejido se calcularon como el % de la media de varios animales no tratados con PCPA y fueron del orden de 0.8 nmoles/g de tejido para los controles y 0.02-0.03 nmoles/g para los tratados. Sólo se consideraron como

animales depletados de 5-HT aquellos con menos del 10 % de 5-HT respecto a los controles.

2.2.7 Verificación histológica

Para la verificación de la localización de los electrodos de estimulación, cánulas y sondas, se procedió a sacrificar al animal con una sobredosis de anestesia. Posteriormente se perfundió al animal con salino y después con una solución de formalina al 4% (Sigma) y se extrajo el cerebro. Los cerebros se conservaron en formalina a 4 °C hasta su procesamiento. Después se realizaron cortes de 70-100 µm mediante un vibrátomo. Los cortes fueron coronales excepto para la descripción de las lesiones en el tálamo, en que los cortes se realizaron sagitalmente. Posteriormente se sometieron a un protocolo para tinción con Neutral Red (colorante rojo, Sigma) y se observaron las lesiones detalladamente bajo un microscopio óptico.

2.2.8 Tratamiento de datos y análisis estadístico

Los registros se analizaron mediante el programa Spike 2 (Cambridge Electronic Design, CED; versiones 2.30 y 4.03).

2.2.8.1 Representación de los resultados

Los resultados se representaron de distintas formas dependiendo del objetivo y la metodología utilizada en cada experimento:

1) *Frecuencia de descarga*: la frecuencia de descarga de una neurona a lo largo del tiempo se representa en forma de histograma, en el que cada barra es la suma de potenciales durante un periodo de tiempo definido previamente (*bin*; habitualmente de 10 s). Mediante esta representación se pueden cuantificar variaciones en la frecuencia de descarga provocadas por la administración de fármacos (ver un ejemplo en la figura 14).

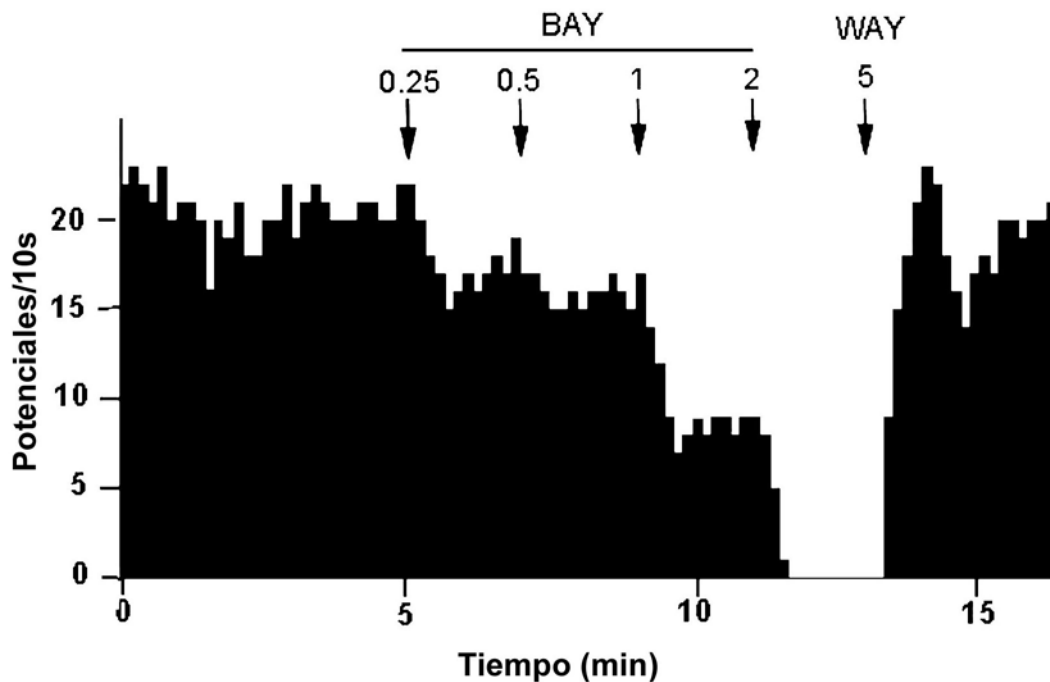


Figura 14. Cambios en la frecuencia de descarga de una neurona serotoninérgica a lo largo del tiempo. Esta neurona responde a la administración sistémica de BAYx3702 (agonista 5-HT_{1A}) reduciendo su frecuencia de descarga y recupera su frecuencia basal tras la administración del antagonista 5-HT_{1A} WAY-100635. La duración de cada barra o *bin* es de 10 segundos. Dosis expresadas en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

2) *Histogramas de periestímulo y rasters*: este tipo de representaciones se utilizan cuando en el experimento se ha estimulado eléctricamente alguna zona del cerebro. En el *raster*, los potenciales de acción originados por la neurona registrada tras cada estímulo eléctrico (habitualmente, cada 0.9 s) se representan como puntos en un diagrama X-Y, en el que la abcisa es el tiempo entre estímulos y la ordenada el número de estímulos administrados de forma repetida. Cada unidad de la ordenada corresponde a uno de los estímulos administrados consecutivamente (típicamente 100-200 veces). Una mayor densidad de puntos a un tiempo determinado post-estímulo (eje X) respecto al valor pre-estímulo indica un aumento del número de potenciales de acción generados (excitación) mientras que la ausencia de puntos indica que la neurona registrada no descarga durante este periodo (inhibición). El artefacto eléctrico producido por el estímulo aparece como una línea continua a tiempo=0.

Otra representación del mismo tipo de fenómeno es el histograma de periestímulo (*peristimulus time histogram*, PSTH). En los PSTHs, el eje de la abscisa corresponde igualmente al tiempo entre estímulos eléctricos administrados de forma secuencial mientras que el eje de ordenadas indica el número de potenciales de acción que se producen a cada tiempo respecto al estímulo. Una ausencia de efecto de la estimulación supondría una distribución homogénea del número de potenciales de acción a los distintos tiempos post-estímulo. Al igual que en el caso de la representación en *raster*, un aumento del número de sucesos por encima del valor pre-estímulo indica una excitación, mientras que una reducción indica una inhibición de la neurona registrada.

Definimos dos tipos de excitaciones: ortodrómicas y antidrómicas, las primeras con una latencia variable respecto al estímulo eléctrico y las segundas de latencia fija. Las excitaciones ortodrómicas tienen una latencia variable pues están generadas por la despolarización del soma de una neurona, la liberación de neurotransmisor desde el terminal y posterior activación de los receptores en la neurona postsináptica que estamos registrando. Las activaciones antidrómicas tienen una latencia fija porque están provocadas por la excitación de un terminal de la neurona registrada, en el que se genera una corriente eléctrica que viaja a través del axón hasta el soma, produciendo la despolarización de éste. La latencia es fija porque tan sólo depende de la longitud del axón entre el terminal estimulado y el soma que se está registrando.

En el ejemplo de la figura 15 se representa en forma de *raster* y PSTH una respuesta bifásica (inhibición a tiempo corto seguida de excitación ortodrómica) de una neurona piramidal a la estimulación eléctrica de una de sus áreas de proyección ya que se excita antidrómicamente desde el área estimulada.

3) Finalmente, en el Trabajo 2 se han realizado curvas dosis-efecto con el fin de poder calcular las ED_{50} de la aplicación local de DOI en la CPFm. Para ello hemos utilizado el programa informático GraphPad Prism (versión 2.00, GraphPad Software).

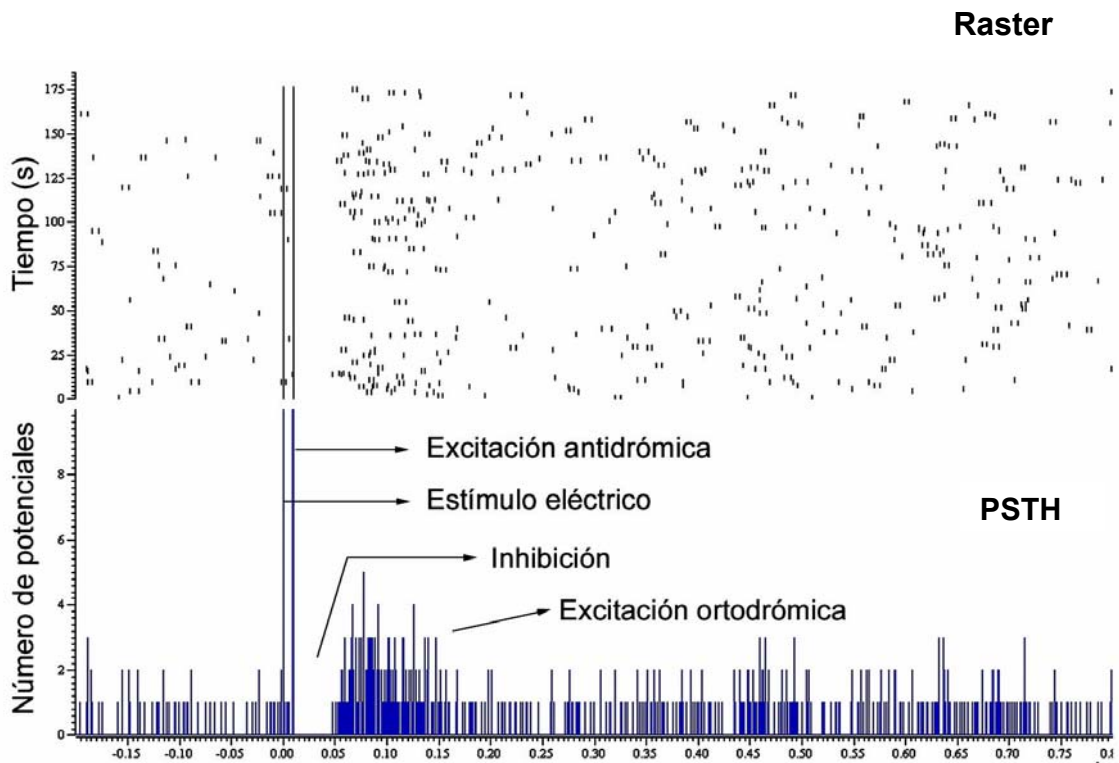


Figura 15. Representación en *raster* y su correspondiente periestímulo de un registro en el que una neurona piramidal responde a la estimulación eléctrica de una de sus áreas de proyección (ya que responde antidrómicamente) mediante una respuesta bifásica (inhibición de duración corta seguida de una excitación ortodrómica).

2.2.8.2 Análisis estadístico de los resultados

Típicamente, se registró a la neurona durante 5 minutos de frecuencia de descarga estable y posteriormente se administró el fármaco. Se calculó la media de la frecuencia de descarga de dos minutos de registro durante el basal y dos minutos a la dosis de máximo efecto del fármaco (siempre omitiendo el primer minuto tras la administración), y se comparó utilizando una *t* de Student de datos apareados. Los resultados se expresan en media \pm EEM.

El análisis de las respuestas observadas en los PSTHs fue complejo y varió para cada tipo de respuesta. Las respuestas fueron caracterizadas midiendo tanto su magnitud como su duración siguiendo el criterio utilizado por Hajós *et al.* (1998).

1) **Inhibiciones:** el comienzo de la inhibición se define como la desaparición total de potenciales de acción durante cuatro *bins* consecutivos o una disminución del 75 % de la frecuencia de descarga con respecto a la frecuencia pre-estímulo. En el Trabajo 5, dada la importancia de establecer con precisión la latencia de las inhibiciones, se determinó el comienzo de éstas como el último *bin* de 1 ms antes del cese de potenciales de acción. En todos los casos, el final de la inhibición se calculó como el primero de 4 *bins* consecutivos con una frecuencia igual o superior a la del pre-estímulo.

2) **Excitaciones:** se define como la zona del PSTH en la que la frecuencia de descarga post-estímulo es superior a la media de la frecuencia pre-estímulo más dos veces la desviación estándar durante, al menos, cuatro *bins*. En el caso de las excitaciones provocadas en las neuronas 5-HT por la estimulación eléctrica de la CPFm, se consideraron excitación los valores de porcentaje de éxito superiores al 10 % (el porcentaje de éxito mide el % de potenciales generados por el estímulo sin tener en cuenta la frecuencia pre-estímulo).

3) **Respuestas bifásicas:** se utilizó la combinación de los análisis anteriores para las inhibiciones y las excitaciones pero para distintas zonas del mismo periestímulo.

2.3 Lesiones del tálamo

En el Trabajo 3 se realizaron lesiones electrolíticas de diversos núcleos talámicos que proyectan a la CPFm, principalmente de los núcleos mediodorsal (MD) y centromedial (CM) (Berendse y Groenewegen, 1991; Van der Werf *et al.*, 2002). Las lesiones consistieron en dos pulsos de 1.5 mA de 10 s de duración cada uno. Los pulsos se realizaron en tres coordenadas distintas dentro del tálamo de cada animal. Estas tres coordenadas son las que utiliza Marek *et al.* (2001) para lesionar el tálamo químicamente con NMDA y se presentan en la Tabla 6.

Los pulsos electrolíticos dañaron principalmente los núcleos MD y CM del tálamo, pero también lesionaron otros núcleos adyacentes que proyectan a la

CPFm: los núcleos paraventricular (PV), paracentral (PC), paratenial (PT) y reuniens (Re). La localización de algunos de estos núcleos se puede ver en la figura 4.

	AP	L	DV
Coordenada 1	-1.8	-0.7	-5.7
Coordenada 2	-2.7	-0.7	-6.3
Coordenada 3	-3.6	-0.7	-6.5

Tabla 6. Coordenadas de las lesiones electrolíticas realizadas en el tálamo. Expresado en mm desde bregma.