



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

Actividad locomotriz, conducta impulsiva y niveles de dopamina en núcleo accumbens y corteza prefrontal en ratas expuestas prenatalmente al alcohol.

Tesis

que para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIA DEL COMPORTAMIENTO
(OPCIÓN NEUROCIENCIA)**

presenta

Patricia del Carmen Muñoz Villegas

Comité tutorial

Dr. Jorge Juárez González (Director)

Dra. Marisela Hernández González

Mtro. Sergio Meneses Ortega

Dr. Félix Héctor Martínez Sánchez

Dr. Alejandro Canales

Guadalajara, Jalisco

Diciembre de 2010

Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

A mi hermosa familia por su apoyo, comprensión y amor.

Al *Dr. Jorge Juárez González* por mostrarme el camino mágico de la Investigación, por sus consejos, las aportaciones tan valiosas que hizo a este proyecto y por su confianza.

A la *Dra. Marisela Hernández* y al *Mtro. Sergio Meneses* por sus comentarios oportunos, sus consejos y acertadas sugerencias.

Al *Dr. Alejandro Canales* del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), por su apoyo técnico y personal, por sus consejos y su amistad.

A la *Dra. Magdalena Giordano Noyola* y a la *Dra. Verónica M. Rodríguez* del laboratorio de Plasticidad Cerebral del Instituto de Neurobiología de la UNAM, por su hospitalidad, consejos y enseñanzas. Especialmente a Vero por prestarme su HPLC, ser la primera en mostrarme Querétaro y llevarme al billar después de echar a perder una columna.

Daniel, Julia y *Yaira María*. Muchas gracias por su amistad, por sentarse junto a mí durante el propedéutico y los 4 semestres que duró la maestría. Por las sesiones de estudio, comidas, consejos, fiestas, visitas al hospital y las tardes de niñas.

Ángeles, Armando, Eliana, Mario y *Paola*. Nuestro laboratorio tiene la fiesta, gracias por su apoyo, confianza, amistad y solidaridad.

A todas las heroicas *ratitas* Wistar que dieron su vida tanto en el piloto como en el experimento. Nunca las olvidaré.

A mi *Job*, por abrirme las puertas de su casa en Querétaro, por todos los partidos de americano, las pizzas con vino, por hacerme sonreír, por su compañía, cariño, apoyo en todo momento y sobre todo por siempre creer en mí. Mil gracias morro.

A la Universidad de Guadalajara, el Instituto de Neurociencias y CONACyT por las facilidades para la realización de este proyecto.

INDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO	
1. Alcohol prenatal.	12
2. Sistema dopaminérgico.	17
3. Trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH), un ejemplo de alteraciones en el sistema dopaminérgico.	23
4. Acción de psicoestimulantes.	26
5. Metilfenidato.	29
6. Modelos empleados para estudiar disfunciones en el sistema dopaminérgico en la rata.	36
7. Modelos Animales para medir impulsividad.	39
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
OBJETIVOS	45
HIPÓTESIS	45
VARIABLES	46
METODOLOGÍA	47
1. Exposición a alcohol prenatal	
2. Tratamiento a crías	
3. Pruebas conductuales	
3.1 Conducta Locomotriz	
3.2 Ansiedad	
3.3 Impulsividad	
4. Análisis de dopamina.	
5. Diagrama de Flujo	
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
RESULTADOS	57

DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES	78
REFERENCIAS	79
ANEXOS	85

ABREVIATURAS

<i>5-choice serial reaction time task</i>	5-CSRTT
Ácido homovanílico	HVA
Alcohol Intragástrico	Alc
Alcohol Intragástrico y metilfenidato	Alc-MP
Alcohol Intragástrico y vehículo de metilfenidato	Alc-v
Área Tegmental Ventral	ATV
Conducta Motriz	CM
Corteza orbitofrontal.	COF
Corteza Prefrontal	CPF
Corteza Prefrontal medial	CPFm
Dopamina	DA
Edad post natal	EPN
Electro encefalograma	EEG
Estriado dorsal	SD
<i>High performance liquid chromatography</i>	HPLC
Intragástrico	ig
Intraperitoneal	ip
Intravenoso	iv
Memoria de trabajo espacial	MTE
Metilfenidato	MP
Número consecutivo fijo	FCN
Monoamino oxidasa	MAO
Noradrenalina	NA
Núcleo Accumbens	NAc
Peso Corporal	BW
Ratas transportador de dopamina bloqueado	DAT-KO
Ratas espontáneamente hipertensas	SHR
Ratas Wistar-Kyoto derivadas hiperactivas	WKHA
Reforzamiento diferencial de tasas bajas	RDL
Sacarosa intragástrica	Sac
Sacarosa Intragástrica y metilfenidato	Sac-MP
Sacarosa Intragástrica y vehículo de metilfenidato	Sac-v
Serotonina	5-HT
Síndrome feto alcohólico	SAF
Sistema Nervioso Central	SNC
Tiroxina Hidroxilasa	TH

Transportador de dopamina	DAt
Trastorno de déficit de atención e hiperactividad.	TDAH
Volumen sobre volumen	v/v

RESUMEN

El sistema dopaminérgico mesolímbico cortical está implicado en aspectos de recompensa, además de estar relacionado con el reforzamiento de ciertas sustancias de abuso como son los psicoestimulantes. La exposición a alcohol prenatal produce afectaciones en este sistema de neurotransmisión (Shen y colaboradores, 1999; Xu & Shen, 2001; Choong, 2004 Wang, 2006) que se manifiesta entre otras cosas por una reducción de la actividad de las neuronas dopaminérgicas (DA) del área tegmental ventral (ATV) (Wang y cols, 2006), la cual puede ser normalizada con la administración de metilfenidato (Choong, 2004; Xu & Shen, 2001). Alteraciones conductuales como son; impulsividad, hiperactividad, ansiedad, falta de atención entre otras, se han asociado a una disfunción en el sistema dopaminérgico; sin embargo, los posibles trastornos conductuales ocasionados por la afectación de este sistema de neurotransmisión debido a la exposición prenatal al alcohol no han sido estudiados. En el presente estudio se analizó la actividad motriz, la ansiedad y la impulsividad en sujetos prepúberes tratados prenatalmente con alcohol así como el efecto del metilfenidato sobre los niveles de dopamina en el núcleo accumbens (NAc) y la corteza prefrontal medial (CPFm) estructuras que forman parte del sistema DA mesolímbico cortical.

ABSTRACT

Mesolimbic dopaminergic system is involved in aspects of reward, besides being related to the strengthening of certain substances of abuse such as psychostimulants. Prenatal alcohol exposure produces affectation in this neurotransmitter system (Shen et al, 1999; Xu & Shen, 2001; Choong & Shen 2004 Wang et al, 2006) which is manifested by reducing the activity of dopamine neurons (DA) of ventral tegmental area (ATV) (Wang et al, 2006), that can be normalized with the administration of methylphenidate (Choong & Shen 2004, Xu & Shen, 2001). The effects of prenatal alcohol in the behavior are not well described, although it is known that a dysfunction in this system may occur with certain behavioral disorders such as, impulsivity, hyperactivity, anxiety, lack of attention among others.

On this basis, this study analyzes the motor activity, anxiety and impulsivity through behavior that mimics the decision-making in situations of risk in prepubertal subjects treated prenatally with alcohol, and the effect of this treatment on the dopamine levels in the nucleus accumbens (NAc) and prefrontal cortex (PFC) structures that are part of the mesolimbic dopaminergic system.

INTRODUCCIÓN

El sistema dopaminérgico mesolímbico cortical (conexiones entre el área tegmental ventral con estructuras límbicas como en núcleo accumbens, tubérculo olfatorio y la amígdala y del área tegmental ventral a corteza prefrontal) está implicado en aspectos de recompensa, además de estar relacionado con el reforzamiento de ciertas sustancias de abuso como son los psicoestimulantes. La exposición a alcohol prenatal produce afectaciones en este sistema de neurotransmisión (Xu & Shen, 2001; Choong & Shen 2004 Wang y cols, 2006) que se manifiesta entre otras cosas por una reducción de la actividad de las neuronas dopaminérgicas (DA) del área tegmental ventral (ATV) (Wang y cols, 2006), la cual puede ser normalizada con la administración de metilfenidato (Choong, 2004; Xu & Shen, 2001) un fármaco psicoestimulante que actúa en este sistema.

También se ha vinculado la alteración en el sistema dopaminérgico con algunos trastornos clínicos, en los cuales el uso de psicoestimulantes es el tratamiento principal de elección al incrementar los niveles de dopamina extracelular disponibles.

Los efectos del alcohol prenatal en el ámbito conductual no están bien descritos, si bien se sabe que una disfunción en este sistema puede presentarse con ciertas alteraciones conductuales como lo son; impulsividad, hiperactividad, ansiedad, falta de atención entre otros, estos problemas conductuales se han observado hasta el momento en modelos animales en edad adulta y en los cuales existe gran variabilidad entre la temporalidad y la dosis a la cual se administra el alcohol. Así, no existen estudios que aborden los efectos conductuales producidos por una disfunción dopaminérgica en animales prepúberes. Esta situación adquiere relevancia si consideramos que en clínica, los trastornos de conducta asociados presumiblemente a una alteración en el sistema dopaminérgico son generalmente diagnosticados y tratados en la infancia, tal es el caso del trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH). Además de que existen discrepancias sobre si las alteraciones conductuales observadas a temprana edad desaparecen por completo en la edad adulta tras el tratamiento con psicoestimulantes.

Una de las principales causas por las cuales conductas como la impulsividad se estudian en animales en edad adulta es porque las pruebas conductuales disponibles hasta el momento requieren largos periodos de entrenamiento a fin de que el animal cumpla los criterios establecidos satisfactoriamente, imposibilitando de esta forma el poder medir este tipo de conductas en sujetos prepúberes, al menos en especies murinas.

Por otro lado, es posible que esta alteración del sistema DA en sujetos tratados prenatalmente con alcohol esté asociada a una deficiencia en la liberación dopaminérgica en las proyecciones del área tegmental ventral con estructuras como el núcleo accumbens y la corteza prefrontal, estructuras involucradas en la actividad motriz y la impulsividad; no obstante, hasta donde sabemos, tampoco hay estudios que analicen esta condición así como tampoco la respuesta de este sistema dopaminérgico ante la administración de psicoestimulantes, los cuales parecen normalizar la actividad de las neuronas DA, pero no se conoce la capacidad de respuesta del sistema ante una estimulación de esa naturaleza.

Con esta base, el presente estudio pretende analizar la actividad motriz, la ansiedad y la impulsividad a través de la conducta que remeda la toma de decisiones ante situaciones de riesgo en sujetos prepúberes tratados prenatalmente con alcohol, así como el efecto de este tratamiento sobre la concentración de dopamina en el núcleo accumbens (NAc) y la corteza prefrontal medial (CPFm) estructuras que forman parte del sistema DA mesolímbico cortical.

MARCO TEORÍCO

1. ALCOHOL PRENATAL

Se ha reportado que la exposición a alcohol prenatal puede influir en la proliferación y diferenciación celular en el sistema nervioso central (SNC) causando retardo en el crecimiento cerebral y déficit en el sistema límbico así como en estructuras involucradas con funciones cognitivas (Aloe, 2006) como lo es la corteza prefrontal.

Por otro lado, la liberación dopaminérgica por las neuronas del ATV ha sido implicada en propiedades reforzantes ante consumo de drogas de abuso, incluyendo el alcohol (Appel y cols, 2006).

El consumo de alcohol en dosis elevadas durante el embarazo se ha asociado con diversos trastornos clínicos como el síndrome feto alcohólico (SAF) en el nacimiento, el cual se caracteriza por retardo en el crecimiento, anomalías morfológicas y disfunciones en el sistema nervioso central (SNC). Los problemas en este último se observan en la reducción de las actividades básicas de adaptación, incluyendo problemas en el aprendizaje y la memoria (Tattoli y cols, 2001). De igual manera, diversos estudios indican que la exposición a alcohol prenatal puede ocasionar cambios importantes en el sistema dopaminérgico a nivel de cerebro medio (Shen y cols, 1999; Xu & Shen, 2001; Choong y Shen, 2004), el cual como es sabido es el sistema de neurotransmisión que ha sido implicado en los aspectos de reforzamiento de diversas sustancias de abuso.

Se ha descrito que el alcohol induce excitación de las neuronas dopaminérgicas del ATV al modular los canales iónicos dependientes de voltaje de estas neuronas. Koyama y colaboradores (2007) reportan que el alcohol excita las neuronas DA del ATV por medio de la reducción sostenida de potasio (K^+) además de incrementar la tasa de disparo de las neuronas DA del ATV acrecentando de esta manera el efecto reforzante del alcohol. Estudios en ratas han evidenciado que la administración de alcohol en etapa gestante causa decremento en la unión de dopamina (DA) y sus metabolitos (Ácido homovanílico y 3,4-dihidroxifenilacético) en los receptores vinculados con esta zona del cerebro (ATV), además de que observaron un decremento en la concentración de DA en CPF en las crías tratadas prenatalmente con alcohol (19 al 35 EPN) respecto a sus controles, concluyendo así que el sistema DA es afectado tras la administración de alcohol en etapa gestante (Rathbun & Druse 1985).

Estudios farmacológicos han demostrado que el sistema dopaminérgico mesolímbico cortical es crítico para reforzar los efectos del alcohol (Appel & Cols, 2006; Koyama &

Cols, 2007; Rathbun & Druse 1985), además se ha reportado ampliamente que la administración prenatal de alcohol puede alterar los sistemas neuroquímicos que están involucrados en la motivación y en aspectos de reforzamiento del consumo del alcohol (sistema dopaminérgico). Otros estudios han señalado que esta exposición puede alterar patrones de respuesta relacionados a la percepción de ciertas características químicas (olor y probablemente sabor) en crías expuestas prenatalmente al alcohol incrementando el consumo de este en la pubertad y la edad adulta (Chotro y Arias, 2006).

Además la ingesta de alcohol durante la gestación afecta de diferente manera a diversas estructuras cerebrales, el grado de afectación de cada área depende en gran medida del período en que se realice el consumo y de la dosis; además, la ingesta de alcohol no sólo afecta el desarrollo del cerebro si no también la funcionalidad neuronal, lo cual indica que se alteran los sistemas de neurotransmisión (Ponnappa & Rubin, 2000). Shen y colaboradores (1999) administraron alcohol intragástricamente durante la gestación (día 8 a 20), en 3 dosis; 0, 3 y 5 mg/Kg BW a ratas; observaron que la actividad espontánea de las neuronas DA en ATV y en sustancia nigra se reducía en ratas de 3 a 5 meses de EPN y que este déficit persistía en ratas de 14 a 16 meses de EPN. Por lo cual, la reducción en la actividad espontánea de las neuronas DA es persistente en edad adulta tras el tratamiento prenatal con alcohol, además; esto no es resultado de una pérdida de las neuronas DA *per se*, como observaron estos autores al realizar las tinciones inmunocitoquímicas con tiroxina hidroxilasa (TH).

Por otro lado, se ha descrito que la administración prenatal de alcohol disminuye la actividad espontánea tipo “marca paso” y otras propiedades de la membrana de las neuronas DA en ATV en animales en desarrollo y en adultos. Este efecto puede contribuir a la disfunción del sistema DA mesolímbico cortical (Wang y Cols, 2006).

Xu & Shen (2001) administraron prenatalmente alcohol (6g/Kg BW del día 8 al 20 de gestación) a ratas, observando que se producía una disminución en la actividad espontánea de las neuronas DA en ATV así como en la neurotransmisión DA. Para comprobar que este efecto no estaba influenciado por el uso de anestesia general a la mitad de los animales los trataron con un anestésico local (bupivacaína) y el resto con hidrato de cloral (crías macho de 6 a 8 semanas EPN). Además de administrarles anfetaminas en dosis agudas (2 mg/Kg iv) a ambos grupos. La exposición a alcohol prenatal disminuyó la actividad espontánea de las neuronas DA en ATV con cambios en los patrones de disparo en las ratas con anestesia local y general y la administración aguda de anfetaminas incrementó la actividad de éstas neuronas tras la exposición a alcohol prenatal.

Diversas investigaciones han mostrado los efectos nocivos del consumo de alcohol sobre el aprendizaje de habilidades en crías de ratas expuestas a alcohol durante la gestación (Riley & McGee, 2005).

En los estudios con tratamiento prenatal de alcohol es importante considerar el período en el que éste se administra y la dosis, Aloe (2006) realizó un estudio en el cual administró una sola dosis de alcohol intragástrica al 20% v/v (4 g/Kg de peso corporal), el día 15 de gestación; esto tomando en cuenta investigaciones previas que refieren que en este día las células cerebrales son particularmente susceptibles de ser afectadas; el autor reporta que la cantidad de alcohol administrada a las ratas gestantes no causó un efecto letal en ellas, además al nacer las crías de estas ratas tenían una apariencia normal, aunque tenían menor peso respecto a las ratas control; sin embargo, a las dos semanas del nacimiento no había diferencias en el peso corporal, así como efectos en el factor de crecimiento nervioso (Aloe, 2006). Por su parte, en 1990 Abello y colaboradores realizaron un estudio en el cual presentaban un régimen diferente de ingesta de alcohol en diversas etapas de la gestación, con el fin de evaluar el efecto del consumo de alcohol sobre el aprendizaje de las crías de éstas ratas. Los investigadores administraron alcohol a una dosis equivalente a 14.29 ml/Kg de manera oral; en cuatro grupos, el primero recibió alcohol del día 1 de gestación al día 11, el segundo del día 12 de gestación al día de parto, el tercero durante toda la gestación y el cuarto fue el grupo que no recibió alcohol en ninguna etapa. Se observó que las crías de las ratas que recibieron alcohol en algún período de la gestación presentaron un déficit en el aprendizaje; no obstante, los resultados obtenidos no fueron suficientes para dilucidar en que etapa de la gestación el consumo de alcohol resulta más crítico para la rata. Por ello, los autores reportan que no existe un período crítico durante la gestación, en el que la administración de alcohol tenga un efecto nocivo diferencial sobre el aprendizaje de crías (Abello y Cols, 1990).

En otro estudio, Arias y colaboradores (2008) administraron alcohol intragástricamente en la etapa gestante en ratas del día 17 al 20 en una concentración que variaba de 0 a 2 g/Kg, los autores reportan que las crías de estas ratas presentaron una alta actividad locomotora y presentaron mayor tolerancia al alcohol cuando éste les fue administrado postnatalmente respecto al grupo control. Además, esta dosis moderada de alcohol en etapa prenatal fue suficiente para inducir hiperactividad en las crías sin afectar el fenómeno de habituación (Arias y Cols, 2008). Por otro lado, Neese y colaboradores (2004) estudiaron el efecto del alcohol prenatal en 3 etapas de la gestación (primera, segunda y tercera semana) sobre la memoria de trabajo espacial (MTE), el alcohol fue administrado a través de una dieta líquida (35% alcohol), la MTE fue evaluada en las

crías de estas ratas a los 60 días postnatales en un laberinto de brazos radiales. Se observaron déficits en la MTE, además de que las crías de las ratas tratadas en la tercera semana de gestación tuvieron un peso significativamente menor del cerebro respecto a las ratas que fueron tratadas durante la primer o segunda semana. Los autores concluyen que el tratamiento de alcohol durante las últimas semanas de gestación tiene un alto impacto sobre la MTE (Neese y Cols, 2004).

Hausknecht y colaboradores (2005), evaluaron la atención de ratas que fueron expuestas prenatalmente a alcohol (día 8 a 20 EPN) en edad adulta, reportando que estos animales presentan problemas de atención similares a los observados en niños con TDAH al presentar tiempos de reacción incrementados respecto a sujetos control, además de un número mayor de respuestas falsas, asociando esto último a una inhibición conductual deficiente, además estos autores señalan que las alteraciones conductuales producto de la administración prenatal de alcohol puede ser mediada por substratos neuronales en común, siendo el sistema DA de un interés particular.

Un resumen de algunos resultados de estudios previos con tratamiento prenatal de alcohol se muestra en la Tabla 1.

Con base en los resultados reportados en la literatura sobre los efectos del alcohol prenatal parece claro que existen discrepancias en los efectos del alcohol cuando es administrado en diferentes etapas de la gestación. No obstante, parece haber bastante consistencia en los resultados cuando el alcohol se administra en una dosis de 6g/kg dividida en dos tomas al día del día 8 a 20 de gestación, tratamiento que produce consistentemente alteraciones del sistema dopaminérgico (Xu & Shen, 2001; Choong & Shen, 2004; Hausknecht y Cols, 2005; Wang y Cols, 2006; Shen y Cols, 2006); lo cual es importante para los análisis realizados en este trabajo.

Tabla 1. Estudios en roedores en los que se utilizó un tratamiento prenatal con alcohol. El tratamiento se continuó en la etapa posnatal (*).

Año	Autor	Dosis y Tratamiento	Resultados
1982	Sigh y Snyder.	20% v/v (dieta líquida), día 1 a 20 gestación.	Bajo peso en las crías, disminución en la ingesta de alimento en la etapa postnatal, alteraciones conductuales.
1985	Rathbun & Druse.	6% v/v (dieta líquida), día 1 a 20 gestación.	Incremento de DA en hipotálamo, decremento de DA en corteza.
1999	Shen y cols.	6 g/Kg ig, día 8 a 20 de gestación	Afecta sensibilidad de los receptores pre y postsinápticos de DA.
2001	Tattoli y cols.	3% oral, 15 de gestación al 7 EPN.	Hiperactividad, problemas de atención, y memoria (*)
2001	Xu & Shen	6 g/Kg ig, día 8 a 20 de gestación	Reducción de la actividad de neuronas DA en ATV.
2002	Cagiano y cols.	3% oral, 15 de gestación al 7 EPN.	Incremento en la ansiedad, aumento en los niveles de DA basal en NAc pero no en CPF (*).
2004	Choong & Shen	6 g/Kg ig, día 8 a 20 de gestación	Alteraciones del sistema dopaminérgico mesolímbico cortical.
2005	Hausknecht y cols.	6 g/Kg ig, día 8 a 20 de gestación	Incrementos en tiempos de reacción (conductas de tipo impulsivas con base en 5-CSRTT).
2008	Arias y cols.	0.5 a 2.5 g/Kg ig, día 17 a 20 de gestación.	Hiperactividad, tolerancia al alcohol postnatal.

2. SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Resultados de estudios en humanos y animales, sugieren que en disfunción del sistema dopaminérgico mesolímbico cortical, originado en el área tegmental ventral (ATV) está presentes en diversos trastornos conductuales como lo es el trastorno de déficit atención con o sin hiperactividad (TDAH) y el SAF. Este sistema esta principalmente implicado en aspectos de reforzamiento para diversas sustancias adictivas.

La DA es considerada uno de los principales factores en la etiología de trastornos conductuales como el TDAH. Esto basado en; a) La neurofarmacología de los diferentes tratamientos con psicoestimulantes, b) los estudios de genética molecular, c) los estudios en pacientes de neuroimagen y, d) la conducta y bioquímica de los diferentes modelos animales (Van der Kooji & Glennon, 2007).

La DA es un neurotransmisor de la familia de las catecolaminas al incluir en su estructura química al grupo catecol (anillo bencénico con dos grupos hidroxilo). La DA se originan de la molécula precursora tirosina. La síntesis de las catecolaminas se muestra en la figura 1.

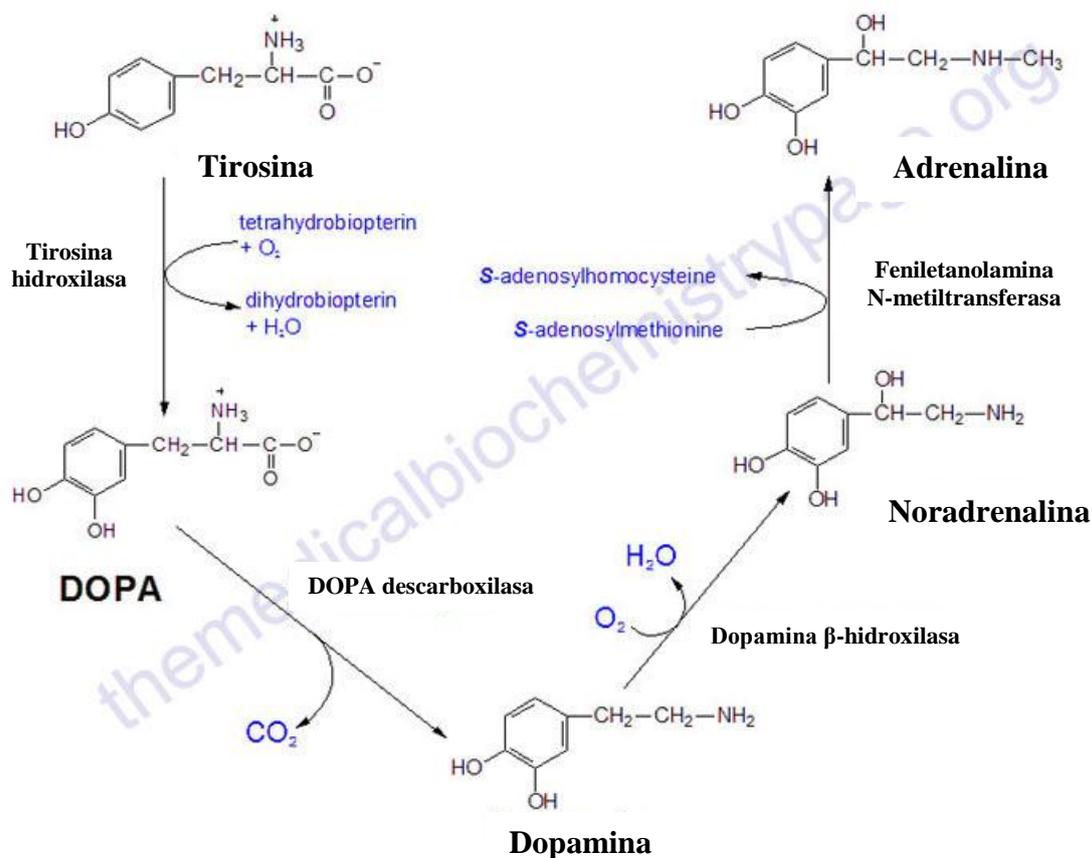


Figura 1. Síntesis de catecolaminas. Tomada de: www.themedicalbiochemistrypage.org

Existen cuatro vías principales de la conducción dopaminérgica; la mesoaccumbens (ATV a NAc), la mesocortical (ATV a CPF), la nigroestriatal (sustancia nigra compacta a estriado) y, la hipotálamo tubero-infundibular (núcleo arqueado hipotalámico, núcleo paraventricular y glándula pituitaria). Las vías mesolímbica y mesocortical se ha reportado que están involucradas en el TDAH (Van der Kooji & Glennon, 2007); ya que la vía mesolímbica se ha asociado a conductas impulsivas y de reforzamiento, y la vía mesocortical a la regulación de procesos de información, atención selectiva, memoria de trabajo, lenguaje y planeación. Además, la vía mesolímbica está involucrada en la conducta motivada a objetivos y en procesos de aprendizaje, la mesocortical en funciones cognitivas y la nigroestriatal en procesos de control motor (Engert & Pruessner, 2008).

La nomenclatura empleada para las proyecciones de monoaminas ha variado desde que comenzó a estudiarse más a fondo al neurotransmisor DA, desde los reportes en donde marcaban la importancia de este neurotransmisor en la región estriada ventral; a mediados de los sesentas Dahlstrom y Fuxe introdujeron una serie de términos para marcar a grupos de células, A1 – A12 y núcleos B1 – 9. Los grupos de células dopaminérgicas del estriado ventral fueron clasificados dentro de 3 núcleos celulares; A8, A9 y A10 (área *tsa*), éste último núcleo fue diferenciado de los otros con base en su selectiva asociación con las aferencias límbicas del ATV (Citado en Ikemoto, 2007).

Se conoce que las neuronas DA se localizan de forma posteromedial al ATV y de manera central al núcleo de Raphe donde proyectan de manera selectiva al estriado ventromedial (tubérculo olfatorio y la parte *shell* del NAc) (Ikemoto, 2007).

Es sabido que la ingestión de drogas como la nicotina u opiáceos tienen valores altamente recompensantes cuando son administrados en la porción posterior al ATV. En la literatura se ha reportado que; a) el ATV tiene proyecciones al NAc (*core* y *shell*); b) la porción estriada del tubérculo olfatorio es una extensión ventral *shell* del NAc; y c) un modelo doble de proyecciones DA de la parte ventral del cerebro al estriado ventral, son importantes para entender las funciones del sistema de recompensa (Ikemoto, 2007).

Otras proyecciones relevantes así como otros neurotransmisores involucrados en el sistema mesolímbico cortical y estructuras afines se muestran en la figura 2.

Algunos estudios sugieren que las neuronas DA mesolímbico corticales pueden estar involucradas en la modulación de daños cognitivos relacionados al alcohol. A su vez, las neuronas DA que proyectan del ATV a regiones límbicas y corticales del cerebro tienen un papel importante en la modulación psicológica y en funciones cognitivas (Dazzi y cols, 2007).

Tattoli y colaboradores (2001) encontraron que los niveles basales de DA y su metabolito el ácido homovanílico (HVA) se elevan en el NAc en ratas a las cuales trataron prenatalmente con alcohol, relacionando esto a la baja regulación de DA extracelular por los receptores D2 (las características de los receptores D1 y D2 se muestran en la Tabla 2).

Las técnicas de imagen (p.ej. Resonancia magnética funcional (RMf)) han sido muy útiles para corroborar el papel reforzante del sistema dopaminérgico sobre las drogas de abuso, estos estudios demuestran que no es el incremento de DA *per se* lo que resulta relevante para el reforzamiento; sin embargo este rápido incremento de DA y la subsecuente activación de los receptores DA, son importantes para este fenómeno. Los estudios de imagen también han revelado que el estado hipo dopaminérgico que sobreviene en los sujetos adictos lleva a la regulación de los circuitos de recompensa y motivación, además este déficit de DA está asociado con la disfunción de la corteza orbito frontal (COF), la cual podría contribuir a la conducta compulsiva que se observa en procesos adictivos por la ingesta de la droga. (Volkow y cols, 2002).

Kuczenski & Segal (2002) reportaron que la administración de metilfenidato (MP) oral durante la fase de oscuridad-actividad del ciclo circadiano afecta la actividad locomotora de las ratas produciendo una sensibilización e incrementa la noradrenalina extracelular en hipocampo sin afectar la dopamina en NAc. Sin embargo, dosis orales bajas de MP no producen un efecto significativo en la DA en NAc ni en otras proyecciones como en la CPF.

Lesiones en el NAc se han relacionado con un incremento en la conducta de impulsividad en ratas (Winstanley y cols, 2005), esto es importante ya que esta estructura cerebral forma parte como ya se ha mencionado del sistema dopaminérgico mesolímbico el cual está vinculado con la regulación del valor hedónico de las sustancias y con el sistema de recompensa, también es sabido que estas proyecciones mediales son importantes en la regulación de la conducta por conducir y modular diferentes papeles de las conductas dirigidas a objetivos (Ikemoto, 2007).

La actividad eléctrica controla la síntesis y liberación de dopamina, la exposición a alcohol prenatal reduce esta actividad lo que puede contribuir a la disminución de la cantidad de DA y sus metabolitos disponibles tanto extracelular como intracelularmente (Shen y cols, 1999; Xu & Shen, 2001), esta reducción en la actividad espontánea de las neuronas DA del ATV tras la exposición prenatal a alcohol puede ser normalizada por el tratamiento agudo y sistémico con metilfenidato y anfetaminas. El MP como las

anfetaminas aumentan la neurotransmisión de DA incrementando sus niveles extracelulares (Choong & Shen, 2004; Xu & Shen, 2001).

Como ya se dijo, el sistema DA mesolímbico cortical juega un papel crucial en el efecto de los psicoestimulantes, la sensibilización conductual es un consecuencia de cambios neuroadaptativos de la inducción a las drogas psicoestimulantes, un proceso que involucra a la neurotransmisión DA y glutamatérgicas y las interacciones entre el ATV, NAc, CPF y la amígdala. Existen algunas discrepancias en cuanto al papel de la CPF en la inducción a la sensibilización por anfetaminas o cocaína, se ha reportado que lesiones en la CPFm impiden la sensibilización a anfetaminas mientras que otros autores reportan que bajo ciertas circunstancias, la CPF ejerce un papel importante en la modulación de la sensibilización a los psicoestimulantes (Vanderschuren & Kalivas, 2000).

La CPF juega un papel importante en la regulación de funciones cognitivas de orden superior como la impulsividad y la conducta, en diversos estudios se ha observado que afectaciones de la CPF están relacionadas con trastornos conductuales como el TDAH. Devilbiss & Berridge (2008) demostraron recientemente que dosis bajas de MP incrementan el flujo de catecolaminas en la CPF, sugiriendo que ésta es el sitio principal de acción en conductas de calma y mejora de la cognición, efectos observables a bajas dosis de psicoestimulantes. Estos autores para demostrar que dosis bajas de MP ip incrementan la actividad neuronal en la CPF, midieron la descarga de actividad neuronal por EEG a diferentes concentraciones de psicoestimulante (0.25, 0.5, 1, 2 y 15 mg/KgBW ip) y analizaron la memoria de trabajo por medio de un laberinto en T. Concluyendo que bajas dosis de MP inducen alteraciones en la CPF, asociadas a un cambio mínimo en la actividad espontánea de las neuronas de la CPF e incrementan la actividad locomotora observándose también aumento del número de estereotipias. Por su parte las dosis altas de MP (15 mg/KgBW ip) carecen de efectos significativos en la actividad locomotora y en problemas que dependen más de cognición (medida en el laberinto en T), se observan efectos mínimos en la actividad de las neuronas de la CPF. Además, ante dosis altas de MP se observa una marcada supresión de las respuestas evocadas en CPF (Devilbiss & Berridge, 2008).

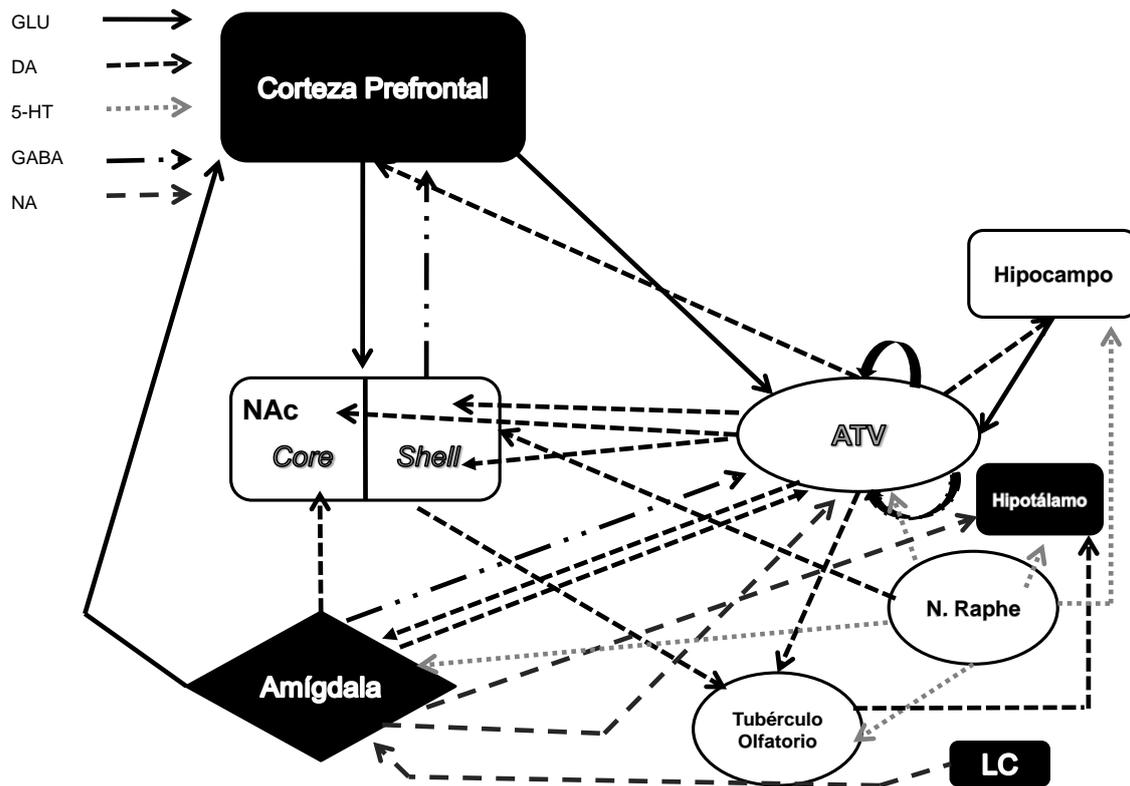


Figura 2. Proyecciones del sistema dopaminérgico mesolímbico cortical y estructuras a fines, con base en: Dumont & Williams, 2004; Ikemoto, 2007; McFarland y cols, 2004; Ubeda-Bañón y cols, 2007 & Zahm & Trimble, 2008.

Como ya se mencionó, afecciones del sistema DA se relacionan con trastornos conductuales como el TDAH, en los cuales el uso de psicoestimulantes como el MP es el tratamiento de elección al incrementar tanto los niveles de DA extracelular disponibles como los de NA, los dos neurotransmisores relacionados a este trastorno. Es sabido que dosis bajas de MP incrementan de manera significativa los niveles de DA y NA en CPF (Berridge y cols, 2006), al ser esta una zona muy sensible a los niveles de catecolaminas (Arnsten, 2006).

Tabla 2. Receptores a dopamina. Subtipos de receptores de DA definidos en estudios fisiológicos, farmacológicos y bioquímicos. **a** [³H]SCH 23390 también puede unirse a receptores 5HT_{1C} y 5HT₂, **b** [³H] spiperona también puede unirse a receptores 5HT_{1A}, 5HT₂ y a receptores adrenérgicos alfa-1.

Familias	D1	D2
Subfamilias	D1 y D5	D2, D3 y D4
Características farmacológicas		
Antagonistas Selectivos	SCH 23390	(-)-Sulpirida YM 09251-2
Agonistas Selectivos	SKF 38393	Quinpirola N-0437
Radioligandos específicos	[³ H]SCH 23390 ^a	[³ H]YM 09151-2 [³ H] Spiperona ^b
Respuesta fisiológica	Aspectos de función motora (cerebro), función cardiovascular.	Aspectos de función motora y conductual (cerebro), control de prolactina y αMSH secreción de la pituitaria, función cardiovascular.
Respuestas bioquímicas	Adenilciclase ↑ Fosfolipasa C ↑	Adenilciclase ↓ Canal de K ⁺ ↑ Canal de Ca ⁺² ↓
Localización	Núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, corteza cerebral, sistema cardiovascular.	Núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, corteza cerebral, lóbulos anterior e intermedio de la glándula pituitaria, sistema cardiovascular.
Tamaño de la proteína (Daltons)		
Afinidad de marcaje	72,000	85,000 – 150,000 (mayor especie de 94,000, 118,000, 140,000)
Purificación	-----	92,000 – 95,000 (cerebro), 120,000 (pituitaria).

Tabla tomada de; Neve & Neve. *The Dopamine Receptors*, 1997.

3. EL TRASTORNO DE DÉFICIT DE ATENCIÓN CONHIPERACTIVIDAD (TDAH), UN EJEMPLO DE ALTERACIONES EN EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.

Es un trastorno en el que existe una alteración a nivel del SNC, en la cual influyen tanto factores biológicos como ambientales, manifestándose conductualmente por un aumento de la actividad, impulsividad y falta de atención, y asociándose con frecuencia otras alteraciones; la incapacidad que existe para impedir impulsos y pensamientos que interfieren en las funciones ejecutivas cuya atención permite superar distracciones, plantearse objetivos y planificar los pasos necesarios para lograr algo. Investigaciones en este sentido, relacionan al TDAH a la inhibición conductual, el cual consideran como la alteración central del trastorno, con la disminución en el sistema ejecutivo, donde la corteza prefrontal juega un papel clave (Muñoz y cols, 2006). El TDAH es más común en los niños que en adultos y presenta una preferencia sexual pues es tres veces más común en hombres que en mujeres. Las afecciones en el sistema DA se han relacionado con algunos trastornos clínicos como el TDAH, en los cuales el uso de psicoestimulantes como el MP es el tratamiento de elección al incrementar tanto los niveles de DA extracelular disponibles como los de NA, los dos neurotransmisores relacionados a este trastorno.

Diversos estudios neuropsicológicos y de imagen han mostrado que el TDAH está asociado con alteraciones en la CPF y sus conexiones con el estriado y el cerebelo. Estudios realizados con modelos animales en combinación de las observaciones arrojadas de pacientes con lesiones corticales han mostrado que la CPF tiene un papel crítico en la regulación de la conducta, atención y la motivación, además es bien sabido que la CPF es útil en la atención sostenida y en la inhibición de factores distractores. Se ha observado en modelos animales que lesiones en la CPF producen distracción, desatención, impulsividad, planeaciones pobres para llegar a objetivos e hiperactividad (Arnsten, 2006).

Se ha reportado en varios estudios que el TDAH está vinculado a una deficiencia en el sistema dopaminérgico, de allí que para su tratamiento se empleen sustancias que incrementan los niveles de dopamina como son las anfetaminas y el metilfenidato. Estimulantes como el MP y las anfetaminas son de los tratamientos más comunes para el TDAH; esto debido al mecanismo de acción de estas sustancias que, como es sabido, actúan sobre las proteínas de recaptura de DA, aumentando la disponibilidad de este neurotransmisor. Por años se ha asumido que los estimulantes tienen efectos paradójicos

de calmantes en los pacientes con TDAH. En ratas, al estimular a animales normales se observa incremento en la actividad locomotora (Arnsten, 2006).

La CPF guía la conducta y la atención utilizando conocimientos representacionales para inhibir acciones inapropiadas, planeación, control impulsivo, perseverar y la desorganización. Algo importante a tomar en cuenta es que la CPF es muy sensible al ambiente neuroquímico, esto es, necesita de niveles óptimos de DA y NA para el control de la conducta y la atención. Alteraciones genéticas en las vías de las catecolaminas pueden estar asociadas con desregulaciones en la circuitería de la CPF lo cual puede conllevar los diversos desordenes observados en el TDAH (Arnsten, 2006).

Brookes y colaboradores (2006) realizaron un estudio en el cual analizaron un halotipo del gen del transportador de DA asociado con el TDAH (DAT1) y su interacción con la ingesta de alcohol durante la gestación encontrando una asociación entre el TDAH, el polimorfismo en el intron 8 y factores específicos de riesgo de éste halotipo el cual mostró una interacción altamente significativa en las madres que ingirieron alcohol durante el embarazo. De esto los autores concluyeron que la interacción entre el genotipo DAT1 y el consumo de alcohol en etapa gestante está relacionada con el TDAH. Sugieren que este transportador (DAT1) modera los factores de riesgo y tiene implicaciones para la prevención del TDAH. Otro estudio sobre la relación del DAT en el TDAH lo realizaron Feron y colaboradores (2005) estudiaron el efecto del MP en 5 niños con diagnóstico de TDAH sobre el transportador DAT al terminar el tratamiento con éste fármaco por medio de tomografías de emisión de fotones las cuales se ha descrito en la literatura que son empleadas para estudiar el efecto de tratamientos prolongados con MP en el sistema DA estriado. En este estudio a los 3 meses de concluido el tratamiento con MP se observó un decremento en la actividad del DAT en el sistema estriado (núcleo caudado y putamen) pero cuando el MP fue administrado por un período más amplio (9 a 20 meses) se observó un incremento en la densidad de DAT en las vías DA nigroestriales. Sin embargo, aún no existe un estudio (en animales o en pacientes con TDAH) que pueda asegurar que el MP ocasiona un daño irreversible en la vía DA estriado.

El tratamiento con MP podría no tener cambios adaptativos iguales en el sistema DA mesolímbico cortical en sujetos normales y en aquellos con una disfunción de éste sistema (pacientes con TDAH). Disfunciones en este sistema de neurotransmisión pueden ser normalizada con la administración de metilfenidato, cuando la intervención terapéutica es temprana (Choong & Shen, 2004; Shen y cols, 2006).

Aunque el foco de este estudio no es estudiar el TDAH, ni la realización de un modelo que remede tal cual las conductas y disfunciones observadas en el mismo, es importante hablar de éste trastorno ya que como se ha mencionado está ampliamente reportado en la literatura la asociación entre una disfunción dopaminérgica y el trastorno, además de que el tratamiento más empleado hoy en día es el metilfenidato. Por esto es importante tomar en cuenta los antecedentes que existen en la literatura sobre el trastorno y su tratamiento ya que esta información nos será útil para interpretar los resultados obtenidos en este experimento.

4. ACCIÓN DE PSICOESTIMULANTES

Tanto el *core* como el *shell* del NAc son sitios primarios de la mediación farmacológica y de efectos condicionantes de las drogas de abuso. Se ha reportado que la corteza del NAc es la región de mayor respuesta a los efectos farmacológicos de la cocaína así como efectos de la morfina y la nicotina. (Citado en D'Souza & Duvauchelle, 2006), además es bien sabido que el núcleo accumbens recibe proyecciones dopaminérgicas del ATV, sobre todo la parte *shell* del NAc y es conocida la implicación del sistema DA en aspectos recompensantes ante diversas sustancias de abuso.

En un estudio realizado por Ikegami y colaboradores (2007) analizaron el efecto del auto administración de cocaína (3 mg/Kg) sobre los niveles de DA en NAc y CPF y la actividad locomotora utilizando una prueba de conducta operante, usando señales con reforzamiento positivo (inyección de cocaína) y sin reforzamiento, empleando dos parámetros conductuales; tras una prueba corta (12 sesiones operantes diarias) y una larga (40 sesiones operantes diarias). Después de un periodo corto de prueba, la DA en el NAc ante señales de reforzamiento positivo (cocaína) fue significativamente mayor que en las señales no reforzadas, pero cuando las señales fueron pareadas alternativamente (cocaína y no reforzadas) los niveles de DA disminuyeron significativamente respecto a su línea base. En pruebas largas no se observó un incremento significativo de DA tras señales reforzadas. En CPF los niveles de DA no se incrementaron respecto a su línea base pruebas cortas (12 sesiones operantes diarias), sin embargo; después de las sesiones largas (40 al día) las señales reforzadas asociadas a la cocaína incrementaron significativamente los niveles de DA en esta estructura (respecto a su línea base). La actividad locomotora se incrementó tras la administración de cocaína (señales con reforzamiento positivo) en ambas estructuras. Tras estas observaciones los autores proponen que el curso del tiempo en la activación neural durante la iniciación del aprendizaje involucra a regiones subcorticales y progresivamente a áreas prefrontales. La CPF está por lo tanto involucrada en el proceso de asociación del aprendizaje a largo plazo y en procesos más complejos de la cognición; como pueden ser el juicio y la toma de decisiones. Tanto en NAc como la corteza prefrontal tienen una relación entre el aprendizaje y en las conductas de tipo adictivas (Ikegami, 2007).

Por otro lado, La dopamina presente en núcleo accumbens y estriado dorsal (SD) es comúnmente asociada con diferentes aspectos de la conducta. El NAc se asocia a procesos de aprendizaje y de reforzamiento de sustancias de abuso y el SD con la actividad locomotora. El aumento de DA en NAc se ha vinculado con el reforzamiento de

los efectos de la cocaína, mientras que en el SD media los efectos motores inducidos por la droga, como el fenómeno de búsqueda tras su consumo. En un estudio realizado por D'Souza y Duvauchelle (2006) compararon los niveles de DA en NAc y SD así como la actividad locomotora tras la administración de una sola dosis de cocaína (1.5 mg/Kg). La concentración de DA y la actividad locomotora se incrementaron significativamente en NAc respecto a el SD. La DA en NAc y SD media la estimulación induciendo hiperactividad y no una activación motora no específica. Además, el circuito de interconexiones existentes entre el NAc y el SD puede permitir la comunicación entre estructuras de integración de la información originadas en diferentes áreas del cerebro (D'Souza & Duvauchelle, 2006). También es sabido que la cocaína incrementa la disponibilidad de DA al bloquear su recaptura actuando sobre el DAT, la potencia de unión de la cocaína a este transportador se ha encontrado que es similar en el NAc y en el SD. Otro psicoestimulante con un efecto similar a la cocaína es el MP.

Como ya se ha mencionado el tratamiento con psicoestimulantes como el metilfenidato (MP), son ampliamente empleados para el tratamiento de los síntomas del TDAH un trastorno conductual en el que se sabe existe una afección del sistema DA, y se sabe poco sobre las bases de los mecanismos neurológicos que describa la acción conductual y cognoscitiva de este psicoestimulante.

La corteza prefrontal está implicada en el TDAH. Además, la DA y la noradrenalina (NA) son moduladores importantes de la cognición dependiente de la CPF. Dosis bajas de MP son comúnmente empleadas en la clínica para el tratamiento de TDAH, hasta la fecha las acciones de las dosis bajas de MP en CPF y la neurotransmisión de la DA y la NA son desconocidas. Berridge y colaboradores (2006) midieron los niveles de DA y NA en CPF (por medio de HPLC), la actividad locomotora (campo abierto) y atención (prueba de palanqueo), tras la administración oral (2.0 mg/Kg) e Intraperitoneal (de 0.25 a 1.0 mg/Kg) de MP. Las dosis bajas de MP mejoraron las funciones cognitivas que dependían de la CPF y que no dependen de los efectos de la activación locomotora (atención), además el MP incrementó el flujo de DA y NA en CPF, aunque fuera de esta estructura dosis tan bajas tienen un impacto mínimo sobre los niveles de estos neurotransmisores. Las dosis bajas de psicoestimulantes activan la neurotransmisión de catecolaminas además de mejorar la atención y funciones cognitivas de mayor demanda que están relacionadas a la CPF (Berridge, 2006).

Como agonista indirecto de la DA, se ha sugerido que el metilfenidato (MP) aumenta la transmisión dopaminérgica en las áreas cerebrales que juegan un papel importante en

aspectos cognitivos y emotivos. Como se mencionó anteriormente el tratamiento en etapa prenatal con alcohol (6 g/Kg) reduce la actividad de las neuronas DA en ATV y esto se puede normalizar tras el tratamiento con MP. Choong & Shen (2004) administraron MP iv en dosis ascendentes (0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, y 16.0 mg/Kg a intervalos de 2 a 3 minutos) en ratas tratadas prenatalmente con alcohol, concluyendo que el efecto del MP fue mediado por el incremento en los niveles extracelulares de DA, especulando que el MP normaliza la actividad de las neuronas DA en ATV incrementando la DA extracelular y activando las dendritas somáticas de los auto receptores de DA. Como resultado de una despolarización combinada con una hiperpolarización de las neuronas DA. El MP puede contribuir a una restauración de la neurotransmisión DA en sujetos con afectaciones del sistema DA mesolímbico cortical. Además, con una dosis baja de metilfenidato (1 mg/Kg iv.) se puede normalizar la actividad eléctrica de las neuronas DA en ATV en animales prenatalmente expuestos con alcohol (Choong y Shen, 2004).

La memoria es uno de los efectos cognitivos que más se ven afectados por el TDAH, ya que los subprocesos de almacenamiento, organización y recuperación se ven afectados por la falta de atención. Por lo cual se han evaluado los efectos del metilfenidato sobre procesos de memoria y conducta en niños ansiosos y no ansiosos con TDAH. El MP mejoró la memoria en niños no ansiosos pero no en los ansiosos; el nivel de actividad locomotora descendió en ambos grupos. La presencia de la ansiedad en los niños con TDAH brinda resistencia a los efectos de la medicación estimulante La terapia cognitiva por si sola es inadecuada, pues se ha mostrado su efectividad únicamente al ser combinada con estimulantes (Johansen y cols, 2009).

5. METILFENIDATO

La exposición a alcohol prenatal produce afecciones en el sistema dopaminérgico mesolímbico cortical (Xu & Shen, 2001; Choong & Shen, 2004 Wang y cols, 2006) que se manifiesta entre otras cosas por una reducción de la actividad de las neuronas DA del ATV (Wang y cols, 2006), la cual puede ser normalizada con la administración de MP (Choong & Shen, 2004; Xu & Shen, 2001) un fármaco psicoestimulante que actúa en este sistema.

Poco se sabe sobre el mecanismo de acción del MP, se conoce que el MP al ser un agonista indirecto de la DA, aumenta la neurotransmisión dopaminérgica en las áreas cerebrales que juegan un papel importante en aspectos cognitivos y emotivos. El tratamiento con MP podría no tener cambios adaptativos iguales en el sistema DA mesolímbico cortical en sujetos normales y en aquellos con una disfunción de éste sistema (pacientes con TDAH). Disfunciones en este sistema de neurotransmisión pueden ser normalizada con la administración de metilfenidato, cuando la intervención terapéutica es temprana (Choong & Shen, 2004; Shen y cols, 2006).

A continuación se describen las generalidades de este psicoestimulante, su farmacodinamia, absorción, distribución, metabolismo, y excreción.

Generalidades

El Metilfenidato (MP) es un medicamento formado por una mezcla 50/50 de los enantiómeros dextrógiro y levógiro o solo del enantiómero dextrógiro. Su nombre químico es el metil-alfa-fenil-2-piperildinacetato.

La fórmula química del MP es $C_{14}H_{19}NO_2$ (Ver figura 3). Su masa molecular es de 233.31 Unidades de masa atómica (UMA). La fórmula química del MP hidrociorado es $C_{14}H_{19}NO_2.HCl$ y tiene una masa de 269.77 UMA.

Estructura química del MP

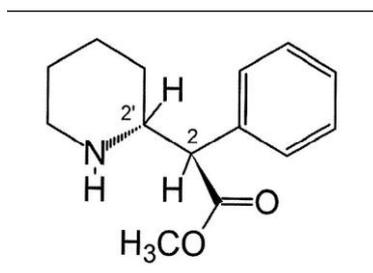


Figura 3

El MP es un estimulante del sistema nervioso central (SNC) que es empleado para el tratamiento del TDAH y la narcolepsia en niños de 6 años y personas adultas respectivamente. Las dosis de MP administradas para estos tratamientos varían con un rango entre los 10 a 60 mg/día en niños y adultos. La dosis recomendada de MP en niños (edad no especificada) es de 0.3 mg/Kg cada dos días e incrementándola gradualmente hasta 0.6 a 0.8 mg/Kg. El MP se administra entre 1 y 3 veces al día, esto dependiendo de las características de la dosis y de la medicación. El MP se encuentra disponible en formulaciones de acción corta, acción intermedia y de liberación prolongada. Generalmente las dosis son entre 2 y 3 veces al día para formulaciones de acción corta, 1 a 2 veces para acción intermedia y de 1 vez al día para las formulaciones de liberación prolongada. El tratamiento generalmente se descontinúa cuando los niños alcanzan la pubertad aunque se ha reportado que entre el 10 y el 60% de los pacientes continúan teniendo síntomas de TDAH en la edad adulta. El MP también es empleado como droga de abuso, inhalando tabletas molidas o inyectándose una solución de MP disuelta en agua. Algunos adictos se inyectan MP junto con heroína o cocaína. Los patrones observados por los adictos son; incremento de la dosis, depresión, y diversas consecuencias sociales y medicas por su abuso (*National toxicology program US, 2005*).

Tabla 3. Farmacocinética del metilfenidato en humanos. **C max**= concentración máxima (ng/ml), **T max**= tiempo máximo (horas), **ABC**= área bajo la curva, **DS** = desviación estándar de la media, * rangos.

Nombre • Dosis • Actividad • Sujetos	C max1 media ± DS	C max2 media ± DS	T max1 media ± DS	T max2 media ± DS	ABC 0 - ∞ media ± DS	Tiempo de Vida Media media ± DS
Ritalin (10) • 20 mg (2 10-mg dosis, 4 hrs) • acción inmediata • niños	10.2 ± 4.2 (4.2–20.2) *	15.3 ± 7.0 (6.2–32.8)	1.8 ± 0.6 (1–3)	5.6 ± 0.7 (5–8)	102.4 ± 54.6 (40.5–261.6)	2.5 ± 0.8 (1.8–5.3)
Ritalin (10) • 20 mg (2 10-mg dosis, 4 horas) • acción inmediata • adultos	4.3 ± 2.3 (1.8–7.5)	5.3 ± 1.4 (3.6–7.2)	1.9 ± 0.4 (1.3–2.7)	5.9 ± 0.5 (5.0–6.5)	37.8 ± 21.9 (14.3–85.3)	3.5 ± 1.9 (1.3–7.7)
Ritalin LA (10) • 20 mg • acción prolongada • niños	10.3 ± 5.1 (5.5–26.6)	10.2 ± 5.9 (4.5–31.1)	2.0 ± 0.8 (1–3)	6.6 ± 1.5 (5–11)	86.6 ± 64.0 (43.3–301.44)	2.4 ± 0.7 (1.5–4.0)
Ritalin LA (10) • 20 mg • acción prolongada • adultos	5.3 ± 0.9 (3.8–6.9)	6.2 ± 1.6 (3.9–8.3)	2.0 ± 0.9 (1.3–4.0)	5.5 ± 0.8 (4.3–6.5)	45.8 ± 10.0 (34.0–61.6)	3.3 ± 0.4 (3.0–4.2)

Adaptado de *National toxicology program US, 2005*.

Farmacodinamia

El MP se clasifica como una catecolamina simpatomimética y como un directo e indirecto agonista adrenérgico. El MP ocasiona excitación a nivel del tallo cerebral y de la corteza. El modelo de acción terapéutica para el TDAH es desconocido. Se propone que el MP bloquea la recaptura de noradrenalina (NA) y dopamina (DA) en las neuronas presinápticas, así incrementa los niveles de estas monoaminas en el espacio extracelular. Un estudio en adultos demostró que tras la administración oral de MP ocurría ocupación de los transportadores a dopamina en la región estriatal del cerebro, pero esto no se observó tan claramente como ante la administración intravenosa de cocaína. El MP puede también inhibir a la monoamino oxidasa (MAO) (*National toxicology program US, 2005*).

Este estimulante ocasiona un decremento en la actividad locomotora en niños con TDAH pero un incremento en esta actividad se ha observado al administrarlo en animales experimentales. Se han especulado varias posibles razones ante este efecto; las cuales incluyen la dosis y el mecanismo de acción del fármaco. En niños la estimulación de la inhibición de auto receptores presinápticos decrementa la actividad DA, así compensa la excesiva actividad DA en estos niños con TDAH. La farmacocinética del MP en humanos niños y adultos se muestra en la tabla 3.

Absorción.

Existen formulaciones de eliminación rápida y de larga acción para el MP. Las primeras son rápidamente absorbidas y su efecto máximo se observa después de una a tres horas posteriores a su ingesta oral. Las de acción prolongada generalmente muestran 2 picos en los niveles sanguíneos en niños con TDAH y en adultos.

Los datos sobre la absorción del medicamento y sin interacción con los alimentos son variados. Un estudio reportó que un desayuno fuerte no afectaba su farmacocinética mientras que otro laboratorio reportó que podía enlentecer su absorción pero sin observarse cambios en la C_{max} ni en el ABC (área bajo la curva). Otro estudio reportó que la ingesta de alimento acelera la absorción de MP en niños hiperactivos pero que reducía su biodisponibilidad. Las dosis de d-MP observadas en plasma fueron similares a las reportadas por la mezcla racémica del medicamento. Ver figura 6 para farmacocinética del metilfenidato (*National toxicology program US, 2005*).

Distribución

El volumen aparente de distribución ante la administración intravenosa de MP es 6L/Kg. El volumen de su distribución fue reportado como 10.7 a 33.2 L/Kg en niños a los que se

les administró de 10-15 mg oral de MP y ~40 L/Kg en niños dándoles ~0.9 mg/Kg de peso corporal. El volumen de distribución excedió el líquido extracelular y el agua total corporal, indicando la unión a tejido. La unión a proteínas plasmáticas es baja, de 10 a 33%. La disposición del MP es estereo específica a dosis orales, resultando altos niveles del *d*-enantiómero respecto al *l*-enantiómero. El pico máximo reportado por el *d*-MP fue 8 veces mayor que el enantiómero *l*-MP. El MP tiene un tiempo de vida media de ~90 minutos, mucho más grande que el tiempo de vida media de la cocaína en el cerebro, que es de 20 minutos. Esto debido a que el MP es un compuesto básico (pK_a 8.8).

Metabolismo.

El metabolismo en humanos es por la esterasa hidrolítica microsomal que transforma rápidamente el MP en ácido α -fenil-piperidina acética, comúnmente llamado ácido ritalinico. Este metabolito presenta baja actividad farmacológica. Menos del 2% del MP es metabolizado por otras vías que involucran su hidrólisis aromática a *p*-hidroxi compuestos, la oxidación microsomal a oxo-compuestos, y la conjugación. El metabolito etilfenidato se identificó recientemente en personas que combinaron el MP con alcohol. El etilfenidato se forma posiblemente por la reacción de transesterificación; se desconoce la significancia farmacológica de esto. En la figura 4 se muestra la vía metabólica del MP en humanos, ratas y perros con los diversos metabolitos en cada una de ellas en común.

Vías Metabólicas del Metilfenidato en Humano, rata y perro.

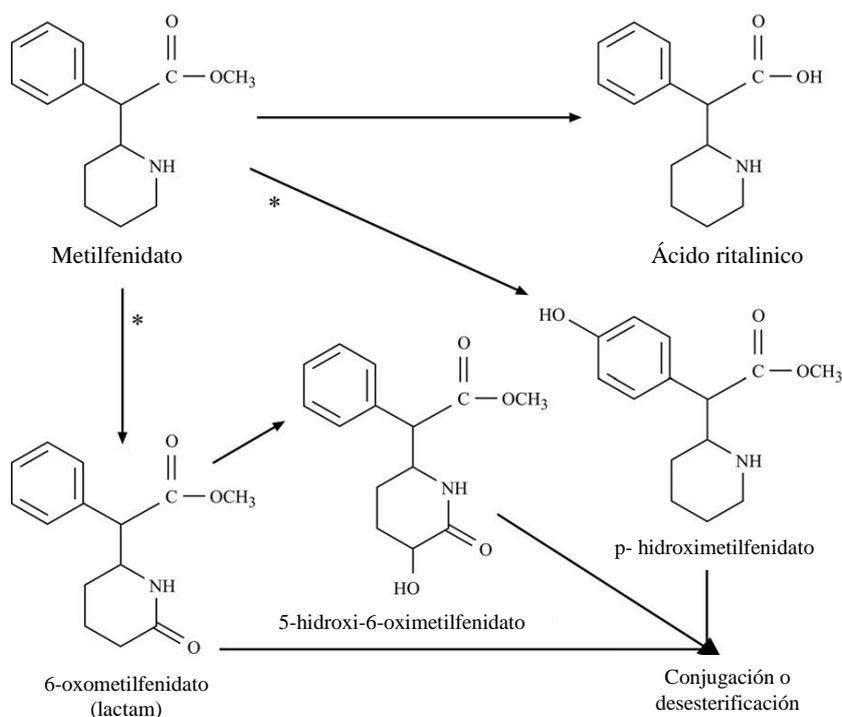


Figura 4. * Vías menores en el humano. Tomado de *National toxicology program US*, 2005.

Excreción.

La vida media del MP en plasma es de ~2 a 8 horas, esto en administración oral con *d*-MP o *d, l*-MP, en dosis de 20 mg para adultos y niños. La media del tiempo de vida media fue de 6.8 horas. La media total en el cuerpo se calculó en 2.52 L/Kg-hora en niños a los que se les administró de 10 a 15 mg de MP.

Dosis orales radiomarcadas de MP se recuperaron entre el 80 y 90% en orina. Novartis reporta que el 78 a 97% del MP es excretado en la orina y que del 1 al 3% es excretado en las heces fecales como metabolito entre las 48-96 horas. El ácido ritalínico es el metabolito mayor en orina, representa entre el 60 al 86% de la dosis. Menos del 1% de la dosis administrada de MP es excretada sin cambio en la orina. El tiempo de vida media del ácido ritalínico es de 3 a 5 horas en muestras racémica de MP y de ~3-8 horas con *d*-MP. La tabla 4 muestra los metabolitos tras la excreción presentes en la orina del MP para humanos y ratas (National toxicology program US, 2005).

Tabla 4. Metabolitos de MP en orina (humano y rata).

Especie/dosis	Ruta	Tiempo (Hrs)	Porcentaje medicamento o metabolito en orina
Humano 20 mg/Kg BW	Oral o iv	0 – 24	Ácido ritalínico (80%); ácido p-hidroxiritalínico (2%); ácido 6-oxoritalínico (<15, 1.5% iv) metilfenidato, p-hidroximetilfenidato, 6-oxometilfenidato, y ácido p-hidroxiritalínico glucoronidado (todos <1%).
Rata 20 mg/Kg BW	Oral	0 – 24	Ácido ritalínico (35-40%), metilfenidato (1%), 6-oxometilfenidato (1.5%); ácido 6-oxoritalínico (7 al 10%); 5-hidroxy-6-oxometilfenidato (2%); ácido 5-hidroxy-6-oxiritalínico (15-17%); carbamida de metilfenidato (1%), desconocidos (20%).

Adaptado de; *National toxicology program US*, 2005.

Diversos estudios han demostrado que el MP posee una farmacocinética similar a la de la cocaína; al actuar de una forma equivalente y al observarse propiedades farmacológicas muy similares. Volkow y colaboradores (1995) hicieron un estudio donde el objetivo principal era comparar al metilfenidato con la cocaína; analizando las diferencias farmacocinéticas del MP hidroclorado (*Ritalin*) en el cerebro humano y compararlo con la

cocaína, evaluando su competencia por sitios de unión. Los autores reportan una distribución de unión del MP similar a la de cocaína, además de que tanto el MP como la cocaína se unen al transportador dopaminérgico (DAT) con una velocidad similar.

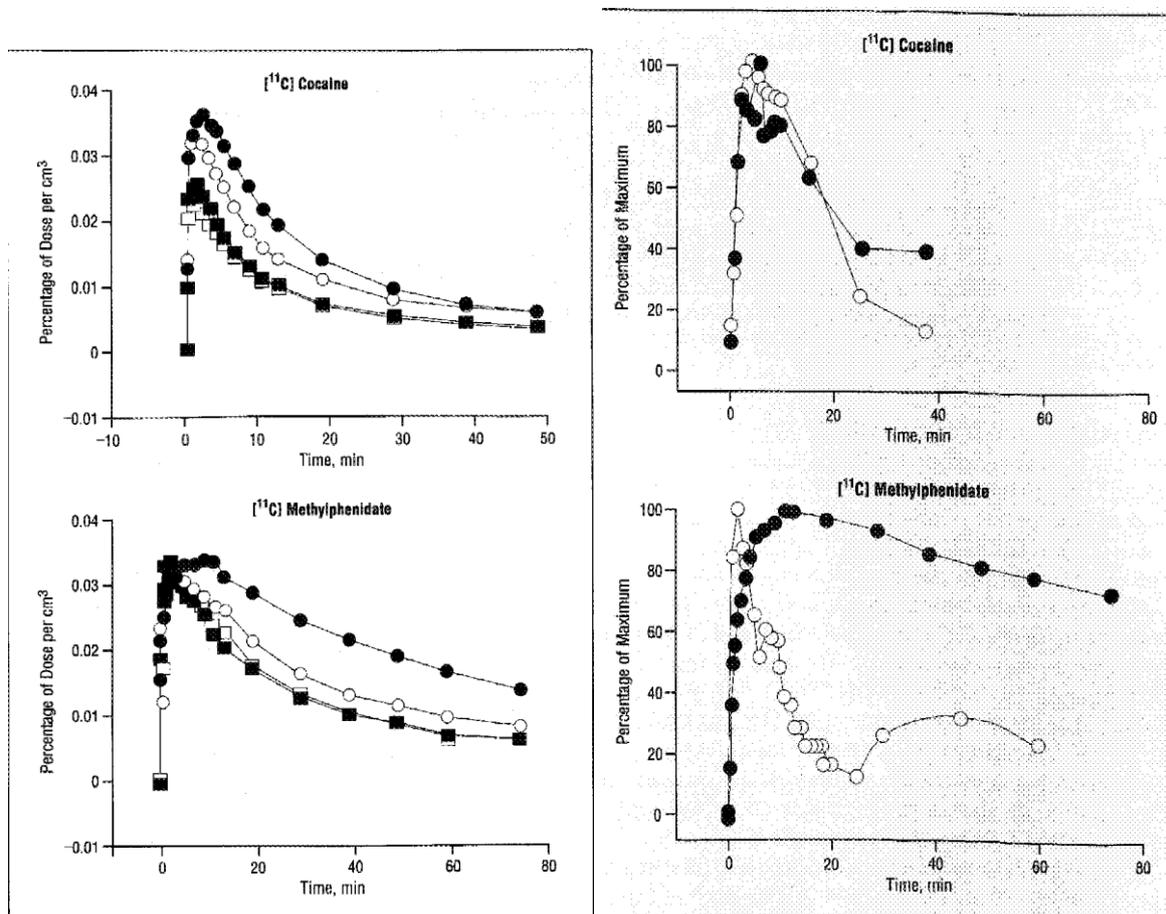


Figura 5. Curvas del tiempo de actividad del MP y la cocaína marcados con ^{11}C . Los círculos sólidos muestran al estriado en línea base, los círculos abiertos al estriado después del MP; los cuadros sólidos al cerebelo en línea base y los cuadros abiertos al cerebelo tras el MP. (Tomado de Volkow y Cols, 1995)

La figura 9 muestra las curvas del tiempo de actividad del MP y la cocaína marcadas con carbono ^{11}C en un estudio realizado por Volkow y colaboradores (1995). En la gráfica de la izquierda, arriba se muestra el estriado y cerebelo de un animal evaluado en línea base (control) y después de una administración de MP hidroclicorado. Los círculos sólidos muestran al estriado en línea base, los círculos abiertos al estriado después del MP; los cuadros sólidos al cerebelo en línea base y los cuadros abiertos al cerebelo tras el MP. Abajo, las curvas de tiempo de actividad para (^{11}C) MP en estriado y cerebelo en un animal evaluado en una línea base (control) y después de la administración de cocaína. Los círculos sólidos indican el estriado en línea base, los círculos abiertos, al estriado después de la cocaína, los cuadros sólidos al cerebelo en línea base, y los cuadros

abiertos al cerebelo después de la administración de cocaína. En estas gráficas se observa el decremento en el estriado para ambos marcadores con la administración de MP y cocaína mientras que la administración en cerebelo no se modifico. Para ambas drogas la rápida absorción en el estriado parece ir a la par de la experiencia de “*high*”. El *high* se puede definir como el sentimiento de euforia y excitación producido por las drogas. Para el MP, su decremento es más rápido por lo cual la sensación no es tan intensa como con la cocaína, además que este *high* se alcanza de manera más lenta. Los autores especulan que la experiencia de *high* está asociada con la rápida administración de ambas drogas en el cerebro, la lentitud con la que el MP da este efecto puede ser un factor limitante para su auto administración.

Existen tres teorías de sobre la funcionalidad del MP en el TDAH; a) Tras el bloqueo del DAT se activa un incremento de la DA extracelular activando solo los autoreceptores presinápticos, lo que lleva a una atenuación de DA en respuesta a los estímulos salientes, b) El incremento de la DA extracelular subsecuente al bloqueo del DAT supera los efectos inhibidores por la activación de los autoreceptores presinápticos lo que conduce a un efecto neto de la acumulación de DA en la sinapsis y la subsecuente amplificación de la señal de DA, y c) Últimamente se está desarrollando una futura hipótesis que involucra a la DA subcortical y la NA prefrontal como los mecanismos que expliquen las acciones clínicas del TDAH (Engert & Pruessner, 2008).

Como ya se ha mencionado el tratamiento con psicoestimulantes como el metilfenidato (MP), son ampliamente empleados para el tratamiento de los síntomas del TDAH un trastorno conductual en el que se sabe existe una afección del sistema DA, y se sabe poco sobre las bases de los mecanismos neurológicos que expliquen la acción conductual y cognoscitiva de este psicoestimulante.

6. MODELOS EMPLEADOS PARA ESTUDIAR TRASTORNOS CON DISFUNCIONES EN EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN LA RATA

Considerando lo anterior es importante tomar en cuenta algunos parámetros que se han empleado para estudiar un trastorno en el cual es sabido que el sistema dopaminérgico está afectado como lo es el TDAH, también es importante hacer una aclaración en este punto; si bien en el presente estudio se trabaja con un modelo de alcohol prenatal en el cual está demostrado que se produce una afectación del sistema dopaminérgico no quiere decir por ello que se considere, al menos hasta el presente, un modelo para TDAH en ratas.

Los modelos animales proveen una visión amplia sobre la neuroquímica de aspectos específicos en conducta para TDAH cuando son comparados con controles apropiados, las diferencias entre el comportamiento de los modelos animales y sus controles pueden ser correlacionadas con las diferencias en su neuroquímica y farmacología conductual (Russell y cols, 2006). El desarrollo y la evaluación de modelos animales que se asemejen a las características clínicas del TDAH son necesarios como requisitos para optimizar estos diseños y lograrlos aprobar clínica y farmacológicamente (Van der Kooij & Glennon, 2007). Los modelos animales tienen una serie de ventajas con respecto a casos clínicos, los datos puede ser más fáciles de interpretar, los grupos son genéticamente más homogéneos, el medio ambiente se puede controlar y hay una gran variedad de intervenciones posibles. Sin embargo, los modelos animales no son un reemplazo para el estudio de enfermedades humanas (Van der Kooij & Glennon, 2007). En la tabla 5 se resumen algunas características importantes que deben de poseer los modelos animales para TDAH.

En una revisión reciente realizada por Sagvolden y colaboradores (2005) se mencionan los criterios necesarios para considerar un modelo animal de TDAH:

1. *Validez de confrontación:* El modelo debe remedar el comportamiento característico del trastorno.
2. *Validez de constructo:* debe de estar basado en un sustrato teórico del padecimiento.
3. *Validez de predicción:* debe ser capaz de predecir aspectos farmacológicos o de conducta desconocidos, pero relacionados con el trastorno.

Los modelos animales para TDAH deben de considerar factores genéticos, conductuales y la acción de psicoestimulantes; lo que se conoce como; validez de confrontación (componentes conductuales), validez de constructo (componentes genéticos) y validez de tipo predictiva (acción de psicoestimulantes). En el primero de estos componentes; el modelo animal debe de reproducir conductas como la hiperactividad, déficit de atención e impulsividad; en la validez de constructo se han reportado alteraciones sobre el DAT y el receptor D₄ (asociados principalmente con la conducta impulsiva y atención) y, la validez predictiva está relacionada con el tratamiento farmacológico con metilfenidato y anfetaminas en sus efectos sobre las alteraciones conductuales (Van der Kooji & Glennon, 2007).

Entre los modelos animales uno de los más empleados es el de las ratas SHR (Ratas espontáneamente hipertensas); aunque es un modelo también muy criticado en la literatura pues pese a cumplir con las 3 conductas de la validez de confrontación (hiperactividad, déficit de atención e impulsividad) y con uno de los parámetros del constructo de validez (efectos sobre el DAT), los psicoestimulantes no ejercen efecto alguno sobre este tipo de conductas en estos animales. Otro modelo animal muy empleado es el de los ratones DAT-KO (transportador de DA bloqueado); en este modelo los animales cumplen con validez de confrontación (hiperactividad e impulsividad); con validez de constructo (bloqueo del DAT) y con validez de tipo predictiva (efecto del MP y anfetaminas); razón por la cual se ha presentado, desde el punto de vista teórico, como un modelo más adecuado para el estudio del TDAH; No obstante, debido a las manipulaciones genéticas necesarias para obtener estos animales se presenta una tasa de mortalidad muy alta; así como otras anormalidades genéticas.

El modelo de ratas Wistar-Kyoto derivadas hiperactivas (WKHA); también es un modelo que cumple con parámetros de validez de confrontación, pero en estas ratas no se han encontrado alteraciones en el sistema dopaminérgico o noradrenérgico (validez de constructo) y al igual que las ratas SHR los psicoestimulantes no tienen efectos sobre estas ratas (validez de tipo predictiva).

Por lo anterior, en la actualidad no existe algún modelo animal que cumpla con todas las características que debe reunir un modelo de TDAH, y en los modelos que cumplen con la mayoría de estos parámetros los psicoestimulantes no presentan acción en ellos (SHR, WKHA, ratas con retardo de crecimiento cerebeloso, etc.).

Tabla 5. Validación de modelos animales de TDAH en parámetros conductuales, genes afectados y respuestas a psicoestimulantes.

Modelo animal	Validez de Confrontación			Validez de constructo		Validez de predicción	
	Hiperactividad	Déficit de atención	impulsividad	DAt	D ₄	MP	Anfetaminas
Lesiones neonatales DA	SI	SI	--	--	SI	SI	SI
Modelo de hipoxia neonatal	SI	--	--	NO	--	--	SI
Modelo prenatal BrdU	SI	--	--	--	--	NO	--
Ratas con retardo de crecimiento cerebeloso	SI	--	--	--	--	NO	NO
Radiación hipocampal	SI	SI	--	--	--	--	SI
SHR	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO
Ratas WKHA	SI	SI	SI	--	--	NO	NO
Ratas NHE	SI	SI	--	SI	--	--	--
Ratón de rueda hiperactivo	SI	--	--	--	--	SI	--
Ratón coloboma	SI	--	--	--	--	NO	SI
Ratón acaloso	SI	SI	--	--	--	--	--
Modelo de ratón DAt KO	SI	--	SI	SI	--	SI	SI
Modelo de ratón DAt KD	SI	--	SI	SI	--	--	SI
Ratón con mutación tiroidea	SI	SI	SI	--	--	NO	SI
Ratón hiposexual	SI	SI	--	--	--	--	SI

Abreviaturas: **BrdU**, 5'bromo-2'deoxiuridina; **D₄**, receptor de dopamina; **DA**, Dopamina; **DAt**, transportador de dopamina; **KD**, desmontables; **KO**, knockout; **NHE**, rata Nápoles de alta excitabilidad; **SHR**, ratas espontáneamente hipertensas, **WKHA**, ratas Wistar-Kyoto hiperactivas. "**NO**" esta característica de TDAH está en contraste con lo propuesto en el modelo animal; "**SI**" esta característica de TDAH está confirmada por lo propuesto por el modelo animal, "--" esta característica de TDAH todavía no se ha investigado en el modelo animal.

7. MODELOS ANIMALES PARA MEDIR IMPULSIVIDAD

La alteración del sistema dopaminérgico se ha asociado en clínica a diversos trastornos conductuales como el TDAH (Arnsten, 2006; Feron y cols, 2005; Russel y cols, 2005), una patología en la que la conducta de tipo impulsiva es una de sus principales características.

En la literatura, existen diversas estrategias para medir la conducta de impulsividad, los paradigmas para evaluar esta conducta están basados en algunas medidas características de la conducta impulsiva como son; 1) castigo y/o extinción, 2) recompensa-elección y, 3) inhibición de la respuesta/ atención (Moeller y cols, 2001).

Es importante tener en cuenta las limitantes en los procedimientos para evaluar esta conducta, entre las principales se encuentra el tiempo que se requiere para que los animales adquieran los criterios correspondientes y se realice la prueba, razón por la cual los estudios en los que se evalúa esta conducta están hechos, en su mayoría, en animales adultos. Pruebas como el *5-choice serial reaction time task* (5-CSRTT), demandan conducta de atención más que de impulsividad; otros como el *Go/no-Go* muestran discrepancias metodológicas en los criterios para evaluar impulsividad de un autor a otro.

Mattel & Portugal (2007) emplearon el paradigma de intervalo máximo (*Peak-Interval*) en el cual la rata tiene que controlar las respuestas en un periodo de tiempo para obtener reforzadores, el principio se basa en la organización de la conducta de una manera eficiente, basada en el aprendizaje de tareas independiente de factores motivacionales como lo sería el tamaño del reforzador, utilizando para ello una cámara operante que consta de tres orificios los cuales se iluminan al azar y combinados con una señal auditiva indicando a la rata en que orificio debe de introducir la nariz para obtener el reforzador. Los autores reportan que varios procesos contribuyen al comportamiento impulsivo; los datos obtenidos del comportamiento variable dependiente del intervalo influyen en el tiempo de inicio de respuesta (parámetro para la conducta impulsiva); estos resultados sugieren que las opciones de respuesta alternativa pueden modular la influencia de la impulsividad en las tareas de tiempo. Esta prueba requiere de un gran número de sesiones para que el animal adquiera el criterio de aprendizaje establecido, razón por la cual se emplea en animales adultos.

Rivan y colaboradores (2007) han empleado el paradigma de números consecutivos fijos (*fixed consecutive number* (FCN)), basado en la inhibición de una conducta no específica. Para este modelo emplean una cámara operante con dos palancas (palanca de FCN y

palanca de reforzamiento); la prueba consiste en que el animal debe de inhibir la conducta de presionar la palanca de reforzamiento antes de terminar el número de palanqueo correspondientes al requerimiento de FCN. Este modelo también tiene un periodo de entrenamiento largo y se emplea en animales en edad adulta. Por su parte Bizot y colaboradores (2007) emplearon un modelo en el cual utilizaron la tolerancia al retraso en la liberación de un reforzador como medida de impulsividad, la prueba se realiza en un laberinto en T, en uno de los brazos el animal recibe el reforzador de manera inmediata y en el otro hay un retardo en la obtención del reforzador el cual es más grande que el reforzador inmediato. Esta prueba presenta algunos puntos a debatir en la metodología, como que el animal no puede cambiar de elección una vez seleccionado el brazo con el retardo de reforzador pues una puerta le impide el salir del mismo. Aun así este modelo cuenta con la ventaja de que se pueden emplear animales juveniles pues no se requiere de un periodo largo de entrenamiento.

Con el fin de evaluar el efecto de la genética en la conducta impulsiva, el equipo de Wilhelm y colaboradores (2007) por su parte, empleo 2 tipos de ratas genéticamente seleccionadas, uno de ellos por su alta preferencia por la ingesta de alcohol (al 10%) y el otro por su baja preferencia por la ingesta de esta sustancia; utilizaron un modelo de devaluación por retraso (*Delay Discounting*) y una prueba *Go/no-Go* (descrita más adelante); la prueba de devaluación por retraso consiste en retrasar la liberación del reforzador devaluando de esta forma el valor incentivo del mismo; para este modelo se emplea una cámara operante con 3 orificios centrales los cuales se iluminan de manera aleatoria para indicar la liberación del reforzador y éstos están pareados en orificios con retraso (a diferentes tasas) y sin retraso. Estos autores reportan que no hubo diferencias significativas entre ambos tipos de ratas sólo para la prueba de devaluación por retraso, sugiriendo que la conducta impulsiva tiene más relación con los problemas para inhibir respuestas evaluadas por la prueba *Go/no-Go*.

Anker y colaboradores (2008) emplearon una prueba *Go/No-go* con el paradigma de inhibición de la conducta utilizando una cámara operante con 2 palancas (*Go* y *no-Go*), cuando la cámara está iluminada la rata debe de presionar la palanca *go* para la obtención del reforzador; la rata debe de inhibir la conducta de presionar la palanca *go* cuando la luz de la cámara este apagada. Esta como todas las pruebas que emplean una tarea de palanqueo, requiere largos tiempos de entrenamiento razón por la cual se emplea en animales adultos.

El equipo de Belin y colaboradores (2008) utilizó la prueba *5-CSRTT* (*5-choice serial reaction time task*), para evaluar la relación entre los niveles impulsividad y las conductas

de tipo compulsivas ante la administración de cocaína, observando que las drogas de abuso favorecen la inhabilidad de retener respuestas prematuras (impulsividad medida como la capacidad de responder antes de la presencia del estímulo). La prueba de 5-CSRTT es medida en una cámara con 5 hoyos que se iluminan aleatoriamente y la rata debe de introducir la nariz en el orificio que se iluminó, después de esto recibe el reforzador en la pared posterior a los orificios. Esta prueba es empleada en la literatura principalmente para medir atención.

Los autores mencionan que un candidato a mediar el control de las respuestas impulsivo-compulsivas es el estriado dorsal (SD) y que este podría activar una cascada de respuestas ascendentes hacia cerebro medio y las vías dopaminérgicas corticales (Belin y cols, 2008). El *5-CSRTT* se basa en la Inhibición de la conducta, además, también es utilizada para medir atención, por lo cual es una de las pruebas más empleadas en modelos animales de TDAH. Orduña y colaboradores (2009) emplearon un modelo de reforzamiento diferencial de tasas bajas (*DRL*) para evaluar el desempeño de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), Wistar-Kyoto (WKY) y Wistar (WIS), analizando los procesos de sincronización y de inhibición de respuesta. Estos autores encontraron que el metilfenidato deteriora el proceso de inhibición de respuestas en las ratas SHR (Orduña y cols, 2009).

En la tabla 6 se muestra un resumen algunos de los modelos animales empleados para medir impulsividad con sus principales características.

Además, se ha propuesto que existen dos tipos de conducta impulsiva; una motora y otra de elección (Arce & Santisteban, 2006; Fineberg y col, 2009; Moeller y cols, 2001; Winstanley y cols, 2005). La primera se refiere a la falta de inhibición ante una conducta preponderante y se ha relacionado al NAc y al SD y, la segunda a la toma de decisiones, involucrando en mayor medida a la CPFm, estructuras de interés en este estudio.

Tabla 6. Modelos animales para evaluar Impulsividad.

Paradigma	Principio	Aparato	Parámetros de medición	Duración de adquisición y prueba	Edad
Intervalo máximo (<i>Peak-Interval</i>) Mattel y cols. (2007)	Control de una respuesta temporalmente	Cámara operante con 3 orificios donde se liberaban los reforzadores de manera aleatoria empleando señales de luz y sonido.	1. Velocidad de respuesta. 2. Retrocesos. 3. Ensayos individuales. 4. Comportamiento variable dependiente de intervalo.	60 días	Adultos
FCN (Fixed Consecutive Number) Rivalan y Cols. (2007)	Inhibición de una conducta no-específica.	Cámara operante con 2 palancas (palanca FCN y palanca de reforzamiento).	1. Eficiencia de respuesta. 2. Largo de cadenas. 3. Porcentaje de cadenas recompensadas. 4. Tasa de respuesta. 5. Latencia de obtención de reforzadores. 6. Aprendizaje del procedimiento antes de iniciar la fase de prueba. 7. Duración óptima de las cadenas.	No especificado	Adultos
Retardo de reforzador. Bizot y Cols. (2007)	Tolerancia a la liberación de un reforzador,	Laberinto en T	Elección del brazo con retardo del reforzador o con liberación inmediata del mismo.	No especificado	Juveniles y adultas.
Retraso de descuento (<i>Delay Discounting</i>) Wilhelm y cols. (2007)	Taza con la que los reforzadores son devaluados.	Cámara operante con 3 orificios centrales, pareados con y sin retraso en la liberación del reforzador.	Punto de indiferencia (elección del reforzador con atraso).	30 días	Adultas
Go/No go Anker y cols. (2008)	Inhibición de la conducta	Cámara operante con 2 palancas (<i>go</i> y <i>no go</i>) con luces que indican la liberación del reforzador.	1. Respuestas durante el periodo <i>No-go</i> . 2. Tasa de respuestas correctas.	30 días	Adultos
5-CSRTT (<i>5-choice serial reaction time task</i>) Belin y cols. (2008)	Inhibición de la conducta.	Cámara con 5 hoyos que se iluminan aleatoriamente y un dispensador de pellets en la pared posterior a los mismos.	1. Precisión (porcentaje de respuestas correctas). 2. Respuestas prematuras. 3. Errores de omisión. 4. Latencia de respuestas.	No especificado	Adultos
Reforzamiento diferencial de tasas bajas. (<i>differential reinforcement of low rates</i>) Orduña y Cols (2009)	Inhibición de respuesta.	Cámara de condicionamiento operante con 2 palancas retractiles de respuesta con estímulos visuales.	1. Variables derivadas de histogramas de frecuencias relativas. 2. Variables relacionadas con el análisis de desviación máxima. 3. Variables obtenidas desde el modelo de regulación temporal.	No especificado	Adultos

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se conoce que el sistema dopaminérgico está implicado en diversos aspectos motivacionales de la conducta y en los mecanismos de reforzamiento. Se ha descrito que la exposición al alcohol en la etapa prenatal (días 8-20) produce una disfunción de este sistema caracterizada por un decremento en la actividad espontánea de neuronas DA en el ATV (Xu y Shen, 2001; Choong & Shen, 2004; Wang y cols, 2006). Por otra parte, en clínica, la alteración del sistema dopaminérgico se ha reportado estar alterado en diversos trastornos conductuales como lo es el trastorno de déficit de atención con o sin hiperactividad (Arnsten, 2006; Feron, 2005; Russel, 2006), en el cual la impulsividad también parece jugar un papel importante. Es bien conocido que el tratamiento farmacológico más indicado para este trastorno han sido los psicoestimulantes, tales como el metilfenidato y las anfetaminas, los cuales precisamente actúan sobre este sistema de neurotransmisión bloqueando la recaptura de dopamina en la terminal presináptica e incrementando, de esta manera, la disponibilidad de este neurotransmisor. Diversos estudios han descrito que la administración de metilfenidato y de anfetaminas a sujetos portadores de una disfunción dopaminérgica por alcohol prenatal produce normalización de la actividad de neuronas dopaminérgicas del ATV (Choong & Shen, 2004; Shen y cols, 2006; Wang y cols, 2006); sin embargo, hasta donde sabemos no hay estudios que analicen la capacidad de respuesta dopaminérgica de este sistema ante la administración de una dosis de algún psicoestimulante.

El estudio de los efectos del alcohol prenatal sobre la conducta, en modelos animales, ha sido extenso; sin embargo, en relación a conductas relacionadas con alteraciones en el sistema dopaminérgico ha sido escaso y los trabajos disponibles evalúan la conducta de los sujetos en la edad adulta. Al parecer esto se debe a que las pruebas disponibles para medir déficit de atención e impulsividad requieren de un entrenamiento prolongado antes de evaluar a los sujetos. Dado que prácticamente no se conocen los posibles trastornos conductuales de sujetos tratados prenatalmente con alcohol en este período donde se produce alteración del sistema dopaminérgico y hasta donde sabemos no existe ningún estudio que evalúe la conducta en estos sujetos antes de la pubertad, el presente estudio pretende analizar la actividad motriz y la impulsividad en sujetos tratados prenatalmente con alcohol y el efecto agudo del metilfenidato sobre los niveles de dopamina en el núcleo accumbens y corteza prefrontal medial en sujetos prepúberes.

Por otro lado, la actividad de los sujetos se ha relacionado con diferentes niveles de ansiedad; por ejemplo, en la prueba de campo abierto se ha descrito que la actividad en los cuadrantes periféricos está asociada a mayores niveles de ansiedad y un decremento en la actividad también se ha relacionado con un incremento en este estado conductual. De esta manera, el presente estudio analizará los niveles de ansiedad en los sujetos con el fin de deslindar la posible interdependencia en estas conductas.

OBJETIVO

Analizar la actividad locomotriz, impulsividad y ansiedad en ratas machos tratados prenatalmente con alcohol y el efecto del metilfenidato sobre los niveles de dopamina en el núcleo accumbens y la corteza prefrontal medial en etapa prepúber.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estudiar la actividad locomotriz por medio de la prueba de campo abierto, la conducta impulsiva a través de una prueba que remeda la toma de decisiones ante situaciones de riesgo (prueba de puente elevado) y la ansiedad en un laberinto en cruz elevado en ratas machos tratados prenatalmente con alcohol.
2. Analizar el efecto del metilfenidato sobre los niveles de dopamina en el núcleo accumbens y la corteza prefrontal medial 30 minutos después de la administración de una dosis única de este psicoestimulante.

HIPOTESIS

La actividad locomotriz y la impulsividad se incrementarán en las ratas machos tratados prenatalmente con alcohol, además las ratas macho tratadas prenatalmente con alcohol presentarán niveles similares de ansiedad a sus controles isocalóricos. Adicionalmente, los niveles basales de dopamina en NAc y CPFm serán menores en las ratas macho tratados prenatalmente con alcohol que en los controles, y el metilfenidato incrementará estos niveles en ambos grupos de manera proporcional a sus respectivas líneas base.

HIPOTESIS ESPECÍFICAS

1. La actividad locomotriz y la impulsividad se incrementará en las ratas machos tratados prenatalmente con alcohol en relación a sus controles isocalóricos, mientras que los niveles de ansiedad serán similares para ambos grupos.
2. La administración de alcohol prenatal producirá un decremento en los niveles de dopamina en el núcleo accumbens y en la corteza prefrontal medial. El tratamiento con metilfenidato, incrementará la concentración de dopamina en el núcleo accumbens y en la corteza prefrontal medial respecto al grupo que reciba sólo el vehículo de metilfenidato.

VARIABLES

INDEPENDIENTES

1. Tratamiento prenatal; alcohol y sacarosa.
2. Tratamiento postnatal; Metilfenidato y vehículo de metilfenidato.

DEPENDIENTES

1. Conducta locomotriz:
 - a) Número de cruces por cuadrantes centrales y periféricos.
 - b) Exploraciones (*rearing*).
2. Ansiedad:
 - a) Permanencia en brazos cerrados vs abiertos.
 - b) Número de cruces (entre brazos).
 - c) Exploraciones.
 - d) Latencia de desplazamiento.
3. Impulsividad:
 - a) Latencia de inicio.
 - b) Tiempo total de traslados en cada puente con ancho novedoso.
 - c) Tiempo total para completar sesión.
 - d) Traslados completos.
 - e) Traslados con omisión de reforzador.
 - f) Caídas.
4. Concentración de dopamina en núcleo accumbens y corteza prefrontal medial.

METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas Wistar, del bioterio del Instituto de Neurociencias, Universidad de Guadalajara, permaneciendo en condiciones estándar de bioterio, en un ciclo de luz-oscuridad natural, con libre acceso a comida y agua, *ad libitum*.

1. *Exposición a alcohol prenatal*

Se utilizaron 10 ratas hembras Wistar de 90 días (entre 200 y 250 g), las cuales se dividieron en dos grupos para el tratamiento prenatal.

Grupo 1: a 5 ratas se les administró alcohol intragástricamente del día 8 al 20 de gestación a una concentración del 20% de alcohol v/v (dosis 6 g/Kg de peso) en dos tomas diarias (3g/Kg de peso) con una separación de 5 horas entre cada dosis; excepto los fines de semana en los cuales se les administró una dosis única de 4g/Kg de peso.

El **grupo 2:** fue el control del **grupo 1**; a 5 ratas se les administró intragástricamente una solución isocalórica de agua con sacarosa v/v (10.5 g/ Kg de peso), en 2 dosis (5.25 g/Kg de peso) diarias con una separación de 5 horas entre cada toma y una dosis única los fines de semana (7 g/Kg de peso), del día 8 al día 20 de gestación.

Durante el tiempo de tratamiento se pesó a las ratas diariamente y se les midió el consumo de comida y agua, los cuales estuvieron disponibles a libre demanda todo el tiempo. Ver anexo 1.

2. *Tratamiento de las crías*

Las crías macho de los grupos anteriores se destetaron a los 21 días de nacidos y se dividieron en 2 grupos; uno integrado por aquellos sujetos tratados con alcohol (Alc, n=20) y el otro, por aquellos tratados con sacarosa (Sac, n=20) prenatalmente. Ambos grupos fueron expuestos al protocolo de pruebas conductuales especificado en los siguientes apartados. A los 24 días de edad posnatal (EPN) se inició con la prueba para medir actividad locomotriz (campo abierto), seguida de la prueba de ansiedad (laberinto en cruz elevado) y finalmente se midió la impulsividad (puente elevado). El calendario de pruebas conductuales se muestra en la tabla 7.

Entre los días 39 y 40 (EPN) a la mitad de los sujetos se les administró una dosis única de metilfenidato intragástrico (5 mg/kg de peso corporal) y a la otra mitad, el vehículo del metilfenidato (Sac-v, n=10; Sac-MP, n=10; Alc-v, n=10 y Alc-MP, n=10), 30 minutos antes de que se sacrificara el animal. Tras el sacrificio por dislocación cervical se extrajeron los

cerebros almacenándolos a -80°C con nitrógeno líquido para la posterior detección de dopamina en núcleo accumbens y corteza prefrontal medial por HPLC.

3. PRUEBAS CONDUCTUALES:

3.1 Actividad locomotriz

CAMPO ABIERTO

Aparato: Dispositivo con el piso de color negro de 60 por 60 cm., cuadrículado (10 por 10 cm) y cercado (30 cm. de altura), (*Figura 6*). Se instaló a la rata en el centro del campo y se cuantificó su recorrido a través de los cuadrantes centrales y periféricos, de igual forma se realizó el conteo de las exploraciones (*rearing*) realizados por la rata a lo largo de la prueba. El registro se hizo durante cinco minutos. Esta prueba se midió cada tercer día a partir del día 24 hasta el día 28 EPN, registrándose un total de 3 evaluaciones; además el día de sacrificio (38 o 39 EPN) se evaluó la conducta motriz (CM) 15 minutos después de la administración de MP ig o vehículo de MP ig.

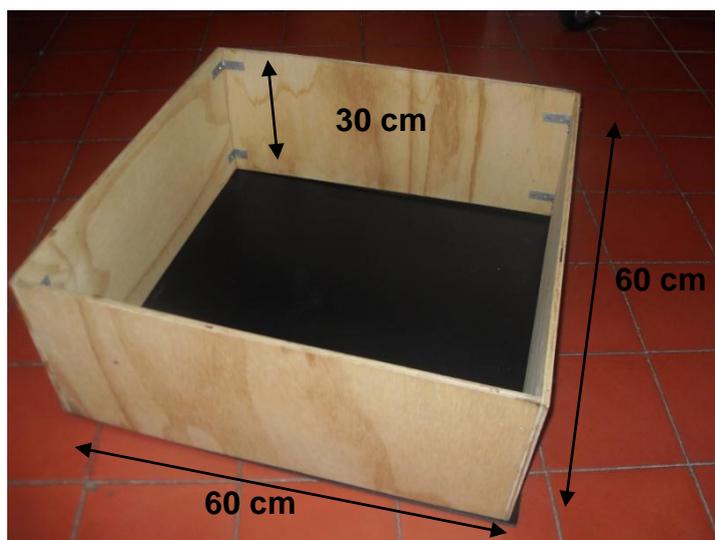


Figura 6. Campo abierto

3.2 Ansiedad

LABERINTO EN CRUZ ELEVADO

Aparato: El laberinto en cruz elevado es un dispositivo que consta de 4 brazos formando una cruz a una altura de 60 cm. Cada brazo tiene un largo de 50 cm. y el ancho es de 10 cm. Dos de los brazos opuestos están cerrados con paneles oscuros de acrílico de 50 cm. de largo, por 50 cm. de alto, con un solo acceso por la parte central, es decir por la

intersección de los brazos. Los dos brazos opuestos restantes están totalmente abiertos en toda su superficie. Cada uno de los 4 brazos se conecta con el cuadro central en un ángulo de 90° relativo al brazo adyacente (Figura 7).

La prueba se realizó al día siguiente de terminada la prueba de campo abierto (día 29). Al comenzar la sesión, las ratas son colocadas en el centro del laberinto. Se evalúa la latencia de inicio (momento en que entra a uno de los brazos ya sea abierto o cerrado), número de cruces, tiempo en brazos cerrados y en brazos abiertos así como el número de conductas exploratorias “rearing” realizados durante los 5 minutos que duró la prueba. Si una rata llega a caer del laberinto se coloca nuevamente al centro del mismo.

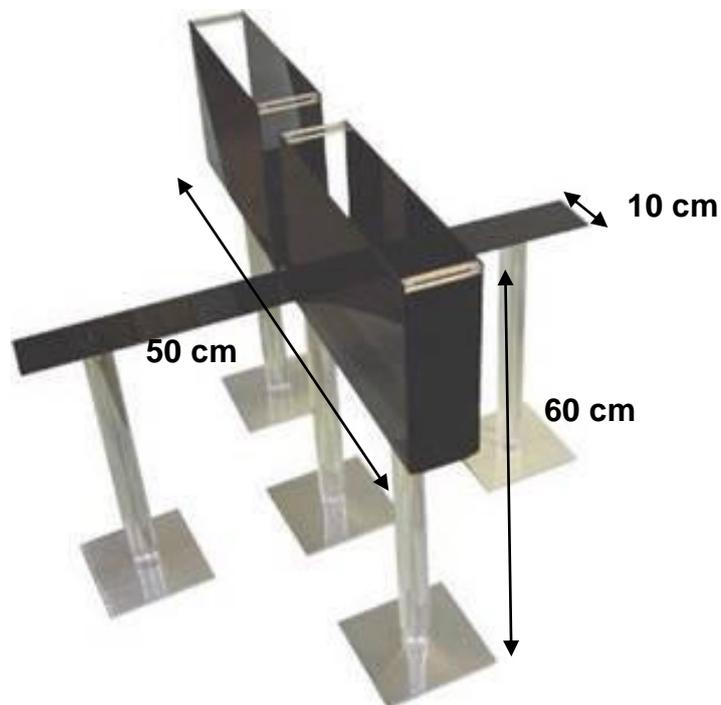


Figura 7. Laberinto en cruz elevado

3.3 Impulsividad

La conducta de impulsividad se evaluó utilizando un puente elevado (Juárez, 2010, patente en trámite) de diseño propio del laboratorio de Farmacología y Conducta. De acuerdo a los parámetros establecidos para esta prueba.

PUENTE ELEVADO

Aparato: Puente elevado construido de acrílico, con una altura de 60 cm respecto del piso, formado por dos pedestales que tienen en su parte superior una plataforma de 10 por 10 cm a una distancia de 60 cm uno del otro. En cada plataforma hay un contenedor donde

se abastecieron pellets como reforzadores. Ambas plataformas se unen a través de puentes de diferente ancho, los cuales varían entre 3.0 y 0.25 cm. (Figura 8).

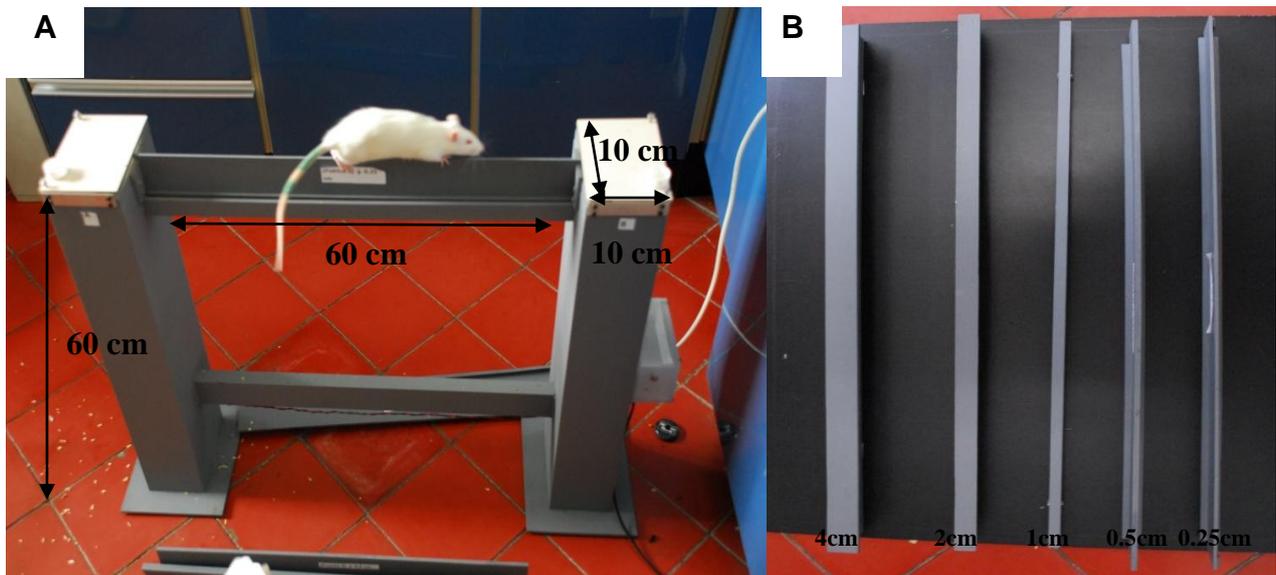


Figura 8. Puente elevado. **A:** Medidas del puente; **B:** Diferentes anchos de puente (4 a 0.25 cm)

Finalizada la prueba de ansiedad, se inició el período de privación de alimento de las 20:00 hrs a las 10:00 hrs. del día siguiente, cuando las ratas fueron abastecidos con pellas de 45 mg. cada una para hacer un total de 900 mg/rata (20 pellas/rata). Una vez consumido se les abasteció con alimento estándar 4 g/rata, transcurridas 2 horas. Al día siguiente se inició la fase de moldeamiento si interrumpir el protocolo de privación de alimento.

Moldeamiento

Se colocó a la rata en la plataforma izquierda del puente elevado con el puente de 3 cm. Se moldeo a los sujetos por aproximaciones sucesivas hasta que el sujeto aprendió que existía un reforzador (1 pella de 45 mg) en cada plataforma después de cruzar el puente. Se consideró que el sujeto aprendió la prueba cuando completó 10 cruces sucesivos en dos días consecutivos. Cada día de moldeamiento, los sujetos siguieron bajo condiciones de privación con un abastecimiento de 4 g/sujeto de pellets estándar, los cuales fueron colocados entre 1.5 y dos horas posteriores a la finalización de la prueba de cada día.

Una vez cumplido el criterio de adquisición, los sujetos siguieron bajo la condición de privación antes descrita.

Prueba conductual

Al día siguiente de haber cumplido el criterio de adquisición:

1. En el primer día de prueba, se colocó a la rata en la plataforma izquierda del puente elevado con los reforzadores preparados en cada plataforma iniciando con el puente de 3 cm., se realizaron 2 traslados y se cambió al siguiente puente (2 cm.) donde también se realizaron 2 traslados; finalmente se utilizó el puente de 1 cm. registrándose 12 traslados. El segundo día de prueba se procedió como en el anterior pero las anchuras de los puentes fueron de 2 cm. (2 traslados), 1 cm. (2 traslados) y 0.5 cm. (12 traslados). El tercer y último día de prueba el ancho de los puentes fue de 1 cm. (2 traslados), 0.5 cm. (2 traslados) y 0.25 cm. (12 traslados).

2. Después de cada dos traslados completos por el puente se cambió el ancho del mismo; es decir, de 3 cm., 2 cm., 1 cm., 0.5 cm. y finalmente a 0.25 cm.

3. Una vez instalado el puente más delgado en cada día de prueba, este permaneció hasta el final de la misma.

4. Se registraron los siguientes parámetros:
 - Latencia de inicio de consumo del primer reforzador.
 - Latencias de inicio de desplazamiento por el puente en cada una de las ocasiones que se encuentre en una plataforma (medida a partir de haber terminado el consumo de cada reforzador).
 - Número total de traslados en el puente de menor anchura en cada día.
 - Número de traslados con omisión del reforzador (medidos en todos los ancho de puente).
 - Traslados incompletos (regresarse a la plataforma de partida antes de llegar a la plataforma del otro extremo). En estos casos se inició el tiempo de latencia de inicio de desplazamiento de la plataforma pero continuó contándose el tiempo en ese traslado.
 - Número de caídas; en estos casos se levantó al sujeto y se colocó en la plataforma de partida inmediata anterior.

- Tiempos parciales para completar la tarea en cada anchura. Contando a partir de la colocación del sujeto para el primer puente y a partir de la colocación de cada uno de los subsiguientes. En todos los casos, el tiempo terminó cuando el sujeto finalizó de consumir el último reforzador en cada anchura y en el último, cuando se suspendió la prueba.
- Se anotó la razón por la cual la sesión fue suspendida.
- Tiempo de cada traslado a través del puente (Cuando fue posible).

La prueba terminó cuando el sujeto completó 12 traslados en el puente más angosto o bien se suspendió cuando el sujeto permaneció 3 minutos en la misma plataforma habiendo ingerido o no el reforzador de esa plataforma y en cualquier anchura de puente.

4. Análisis de dopamina:

Después de terminar las mediciones de la prueba de impulsividad (día 38-39 EPN), se restableció la administración de alimento *ad libitum*. Al día siguiente se sacrificó a los animales por medio de la técnica de dislocación cervical, se les extrajo el cerebro en un tiempo no mayor a 2 minutos y este se congeló hasta -80°C con nitrógeno líquido, manteniéndose a esta temperatura hasta el momento de la cuantificación de dopamina por HPLC.

Las rebanadas de tejido se cortaron con base al atlas de Paxinos & Watson 6ta edición, colocando los cerebros sobre una cama con hielo y realizando los cortes auxiliándose de las imágenes del atlas con las siguientes coordenadas; NAc de bregma 1.68 mm, AP; 7.0 – 7.5; ML, 0.8 – 1.4 y para CPF de bregma 12.24mm, AP; 3.4 – 3.8; ML, 0.4 – 0.8 aproximadamente (Gao y cols, 2007, Ishikawa, 2006). *Figuras 9 y 10*. Los cortes se realizaron bilateralmente y se realizó un homogenizado de tejido para el análisis.

Después de cortados los tejidos se procedió a la cuantificación de DA por la técnica de HPLC utilizando una fase móvil de fosfatos y una columna para la detección de catecolaminas (100 mm de largo y 4.6 mm de grosor).

Los pasos para la preparación de las muestras se encuentran en el anexo 2.

Coordenadas para NAc y CPFm.

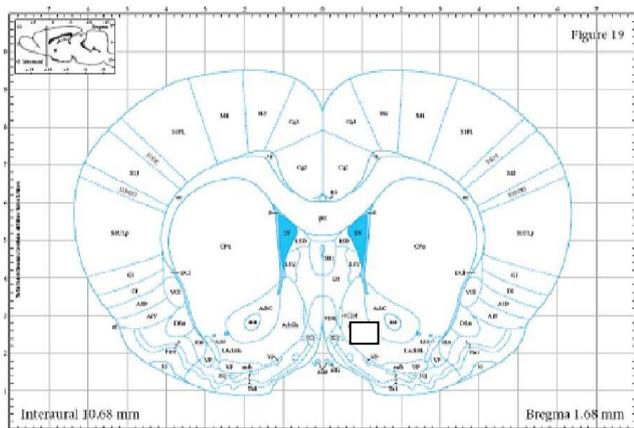


Figura 9. Coordenadas en Núcleo accumbens para la cuantificación de dopamina; AP 1.68 mm posterior a Bregma; LM 0.8 – 1.4 mm bilateral a la línea media; DV, 7.0 a 7.5 mm a la superficie del cráneo. Tomado de Paxinos y Watson, 2007.

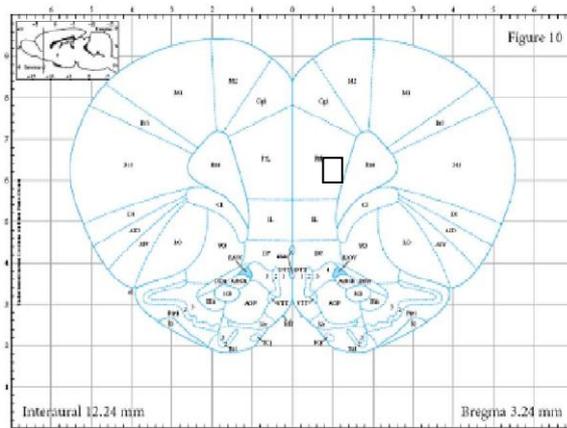


Figura 10. Coordenadas en Corteza prefrontal medial para la cuantificación de dopamina; AP, 3.24 mm posterior a Bregma, LM 0.4 – 0.8 mm bilateral a la línea media, DV a superficie del cráneo, 3.4 – 3.8 mm. Tomado de Paxinos y Watson, 2007.

Tabla 7. Calendario de pruebas conductuales; Las crías se destetaron el día 21 de edad postnatal (EPN) y se comenzó su evaluación en el campo abierto el día 24 EPN, la prueba en el laberinto en cruz elevado se realizó el día 29 y las mediciones en el puente elevado se registraron los días 36, 37 y 38 postnatal. * Estas fechas pueden variar cuando la rata no cumple criterio en el período de tiempo establecido.

	Destete	Campo Abierto	Laberinto en Cruz elevado	Puente Elevado	Sacrificio
Edad posnatal (días)	21	24,26 y 28	29	36,37 y 38*	39 – 40

Criterios de exclusión:

1. Animales que no cumplieron con los criterios establecidos en las pruebas conductuales.
2. Animales que nacieron con bajo peso significativo (menor al 80% de peso corporal).

3. Cerebros que no se congelen adecuadamente o que se lesionen al momento de extraer del cráneo.
4. Cerebros que se corten mal al hacer la separación de tejido para el análisis de dopamina.

5. PROCEDIMIENTO, diagrama de flujo.

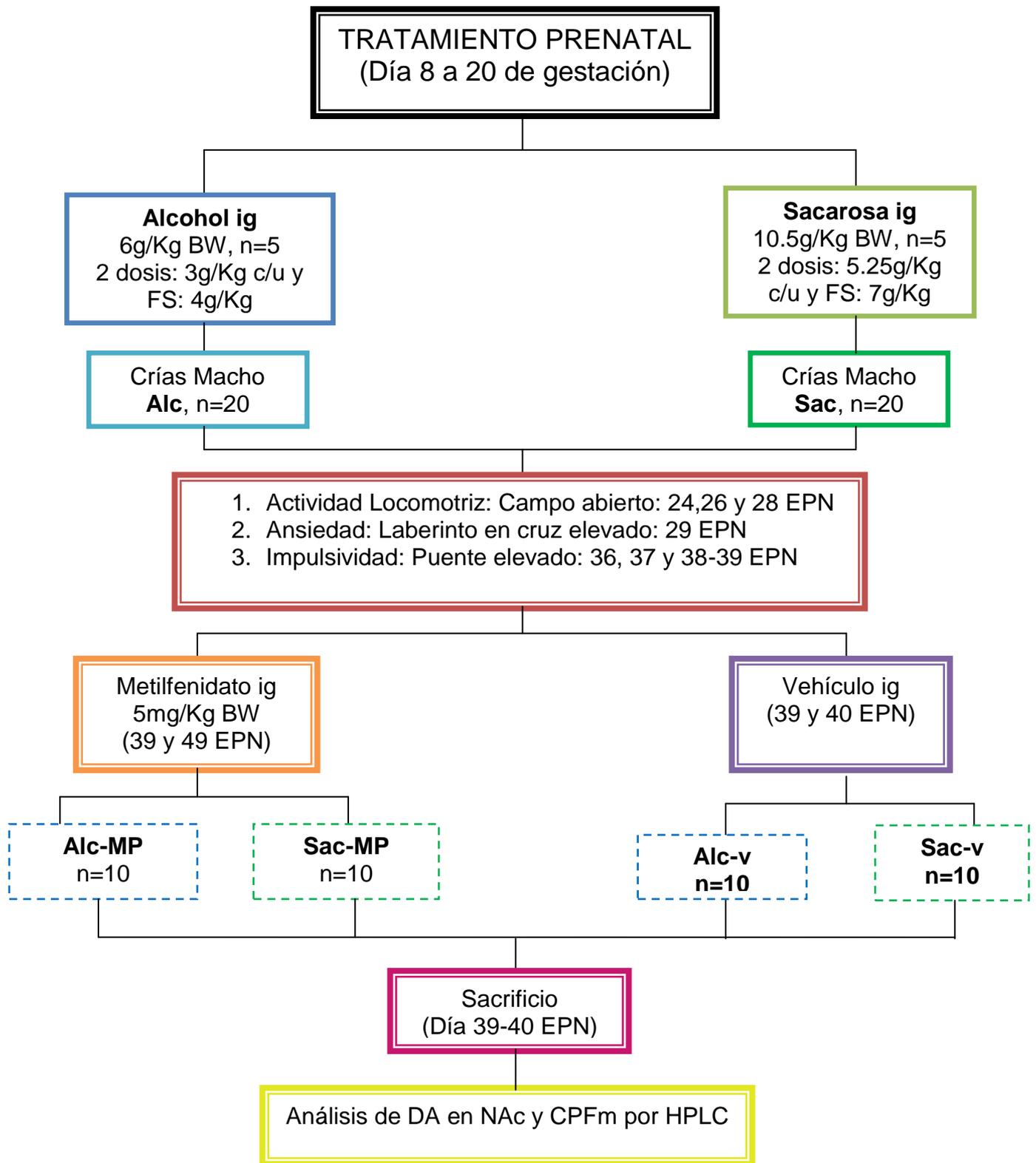


Figura 11. **Alc:** Tratamiento prenatal con alcohol intragástrico, **Sac:** Tratamiento prenatal con sacarosa intragástrica, **g/Kg BW:** gramos/kilogramo de peso corporal, **EPN:** Edad posnatal, **FS:** Fin de Semana, **Sac-v:** Tratamiento prenatal con sacarosa intragástrica y vehículo de metilfenidato, **Sac-MP:** Tratamiento prenatal con sacarosa intragástrica y metilfenidato, **Alc-v:** Tratamiento prenatal con alcohol intragástrico y vehículo de metilfenidato, **Alc-MP:** Tratamiento prenatal con alcohol intragástrico y metilfenidato, **HPLC:** *High performance liquid chromatography*.

ANALISIS ESTADISTICOS

Al comprobar que existía homogeneidad de varianzas entre grupos, se empleó un diseño mixto de parcelas divididas (p x q) para grupos independientes para los datos de actividad locomotriz e impulsividad además; para la prueba de ansiedad se realizó un ANDEVA de una vía para grupos independientes.

Para el análisis de ganancia de peso en la prueba de impulsividad se realizó un ANDEVA de una vía.

Para los análisis a posteriori se utilizó la prueba de Tukey, tomando en cuenta un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, en todos los casos.

RESULTADOS

CONDUCTA LOCOMOTRIZ:

Se realizó un diseño mixto de parcelas divididas de tres factores para analizar la actividad locomotriz (grupo x edad x tipo de cuadrantes (centrales o periféricos)) Se observaron diferencias significativas entre grupos ($F_{(1,119)} = 14.41, p < 0.001$), lo cual indicó mayor actividad en el grupo tratado prenatalmente con alcohol; también se observaron diferencias significativas entre los cuadrantes centrales y periféricos ($F_{(2,114)} = 4.61, p < 0.01$) siendo mayor el número de cruces por los cuadrantes periféricos independientemente del grupo y los días. Además el factor días resultó significativo, indicando, mayor actividad en el día 24 respecto al 26 y 28 ($F_{(1,119)} = 483.05, p < 0.001$). La interacción grupos por tipo de cuadrantes fue significativa ($F_{(2,114)} = 7.18, p < 0.01$), la cual indicó mayor actividad en el grupo Alc que en el control, pero sólo en los cuadrantes periféricos. La interacción cuadrantes por edad resultó significativa ($F_{(2,114)} = 5.57, p < 0.005$), para los cruces por cuadrantes periféricos respecto a los centrales los 3 días de medición (Figura 12).

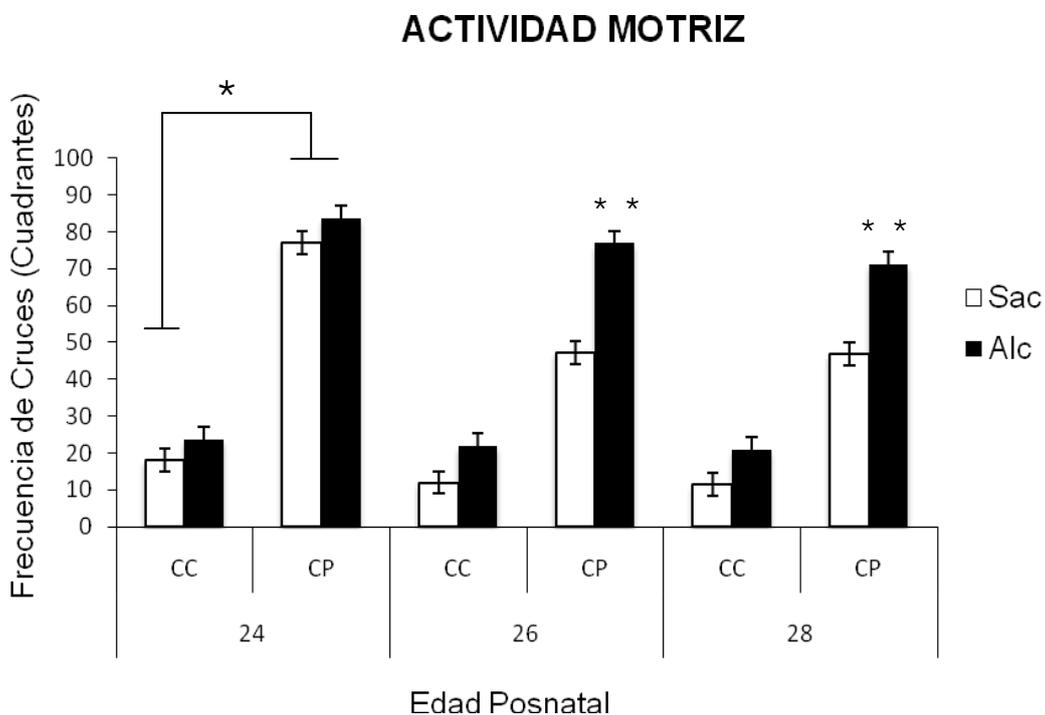


Figura 12. Frecuencia de cruces de cuadrantes centrales (CC) y periféricos (CP) en los 3 días de registro (24, 26 y 28 EPN) en la prueba de campo abierto para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc). La prueba fue de 5 minutos. Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas entre grupos Alc > Sac para ese día, 24 > 26 y 28 (**) y tipo de cuadrante CP > CC (*).

En la interacción entre los grupos Sac y Alc respecto a las edades postnatales del análisis anterior (grupo x edad) para el cruce total de cuadrantes (centrales más periféricos), se observaron diferencias significativas en entre grupos ($F_{(1,38)} = 7.76, p < 0.01$) lo cual indicó que el grupo tratado prenatalmente con alcohol mostró una mayor actividad locomotriz. También se observaron diferencias en el factor días, con una actividad mayor el día 24 respecto al 26 y 28 ($F_{(2,76)} = 7.77 p < 0.001$). La interacción entre tratamiento y los días no fue significativa (Figura 13).

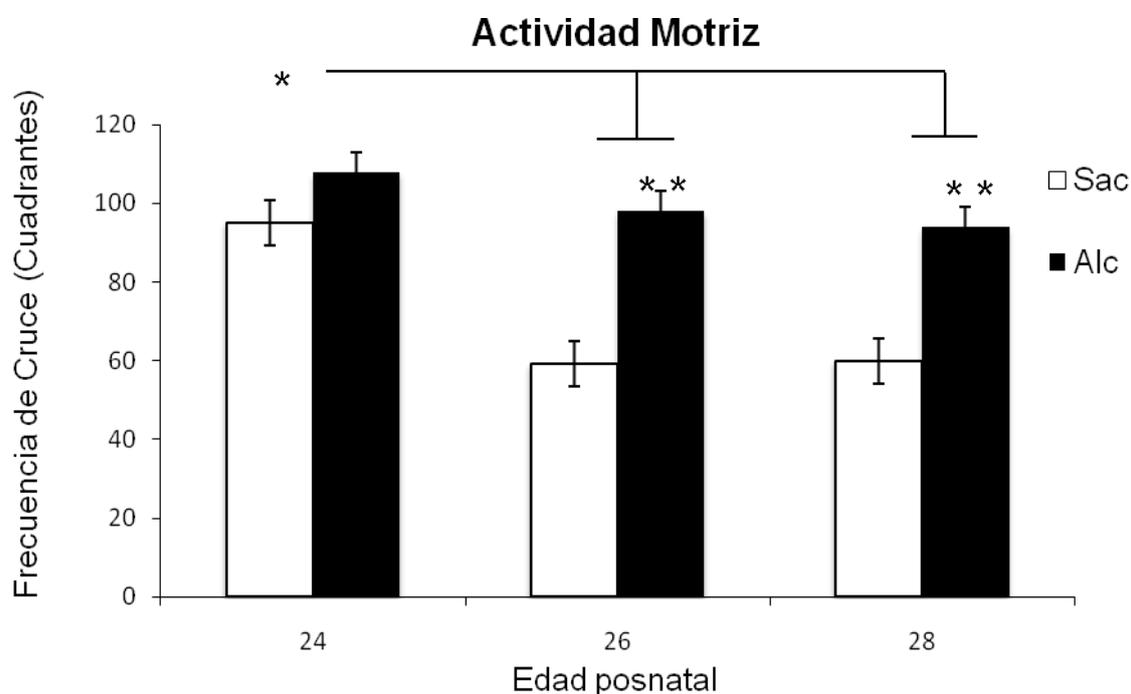


Figura 13. Frecuencia en el cruce de cuadrantes totales en los 3 días de registro (24, 26 y 28 EPN) en la prueba de campo abierto para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc). La prueba fue de 5 minutos. Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas entre grupos Alc > Sac (**) y para ese día 24 > 26 y 28 (*).

Se realizó un diseño mixto de parcelas divididas (grupo por edad), para analizar la conducta de tipo exploratoria “*rearing*”. Las exploraciones realizadas por las ratas con tratamiento de alcohol prenatal mostraron una tendencia a ser mayores que las ratas Sac sin embargo, las diferencias no fueron significativas para los grupos ($F_{(1,38)} = 3.26$, $p > 0.05$), se observaron diferencias significativas entre los días de medición, indicando un número mayor de exploraciones en el día 24 respecto al 28 ($F_{(2,76)} = 3.66$, $p < 0.05$). La interacción entre grupos y días fue significativa ($F_{(2,76)} = 4.83$, $p = 0.01$), lo cual indicó mayor número de exploraciones en el grupo Alc que en el control, pero sólo en los días 26 y 28 (Figura 14).

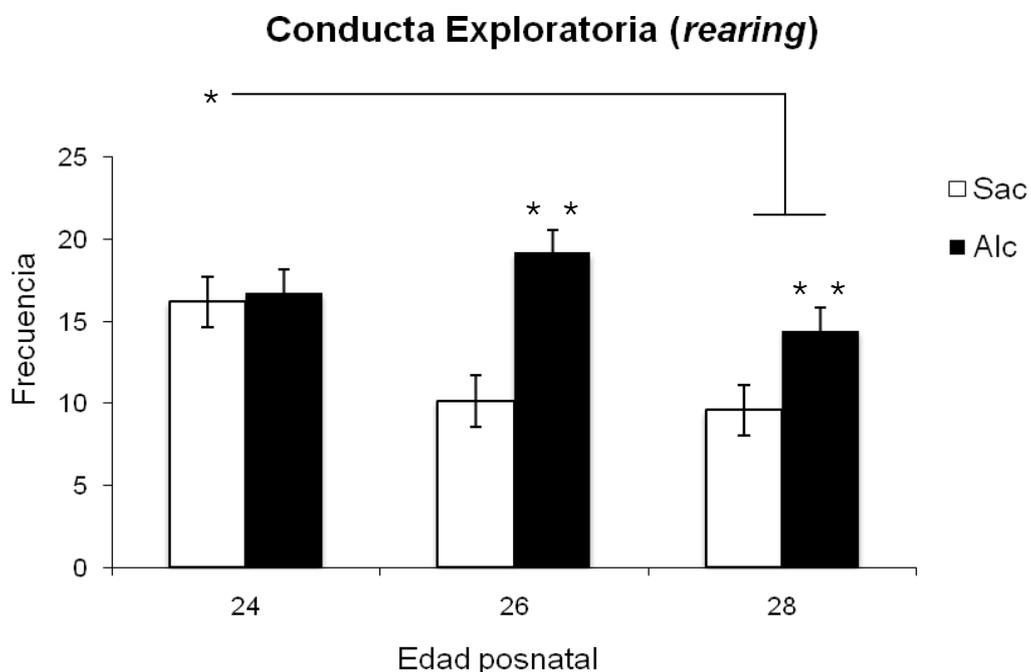


Figura 14. Frecuencia de exploraciones en los 3 días de registro (24, 26 y 28 EPN) en la prueba de campo abierto para las ratas tratadas con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc). La prueba fue de 5 minutos. Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas entre los días de medición 24 > 28 (*) y entre grupos para ese día de medición (**).

ANSIEDAD

Se realizó un análisis de varianza de dos factores (grupo x brazos), para analizar los niveles de ansiedad en un laberinto en cruz elevado. No se observaron diferencias significativas entre grupos en la permanencia entre brazos cerrados o abiertos ($F_{(1,39)} = 0.01$, $p < 1.0$). Se observaron diferencias significativas entre la preferencia por brazos cerrados respecto a los abiertos ($F_{(1,38)} = 41.98$, $p < 0.001$), siendo mayor la preferencia a brazos cerrados (Figura 15). No se observó interacción entre el factor grupo y la permanencia en los brazos del laberinto.

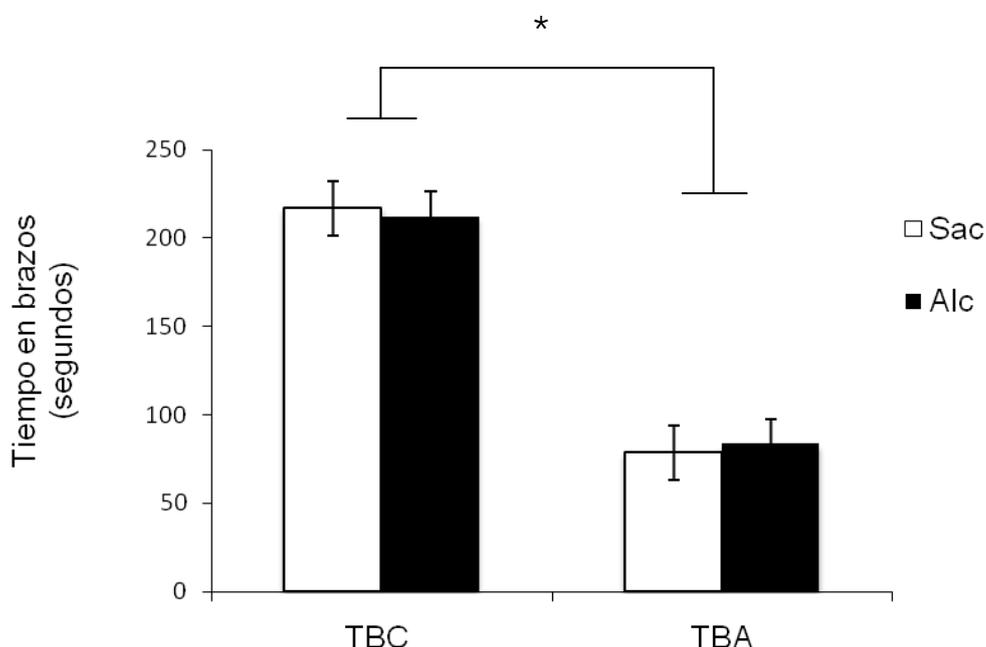


Figura 15. Permanencia en brazos cerrados (TBC) y abiertos (TBA) en la prueba de ansiedad para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc). La prueba fue de 5 minutos. Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas entre brazos TBC > TBA (*).

Se realizó un análisis de varianza de un factor, para analizar el número de conductas de tipo exploratorias (*rearing*) realizado en la prueba de ansiedad. El grupo con tratamiento prenatal de alcohol mostró un mayor número de conductas de tipo exploratorias respecto a su grupo control ($F_{(1,38)} = 5.945$, $p < 0.05$), en cruz elevado (Figura 16).

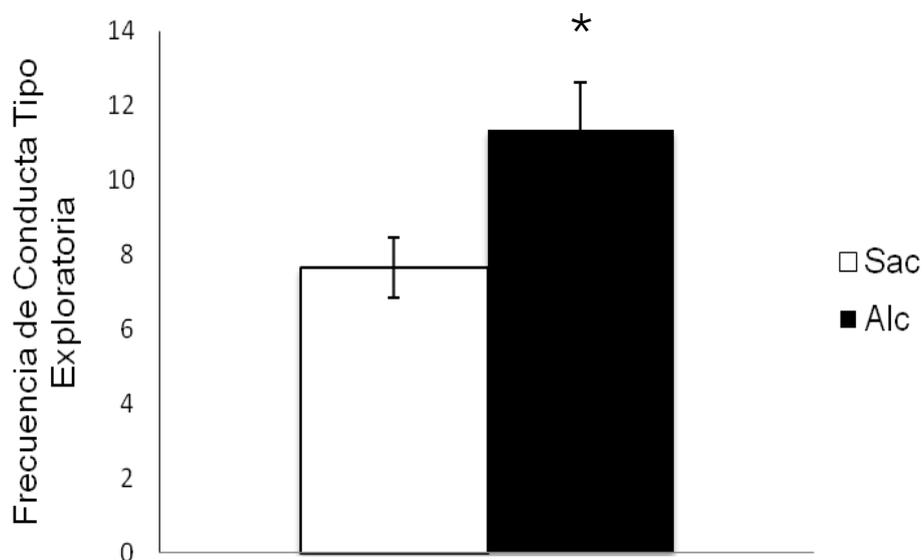


Figura 16. Frecuencia de conducta tipo exploratoria (*rearing*) en la prueba de ansiedad para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc). La prueba fue de 5 minutos. Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas entre grupos Alc > Sac (*).

Se realizó un análisis de varianza de un factor para analizar el número de cruces (entre brazos cerrados y abiertos) realizados en la prueba de ansiedad. No se observaron diferencias significativas entre grupos ($F_{(1,38)} = 0.164$ $p > 0.5$) (Figura 17).

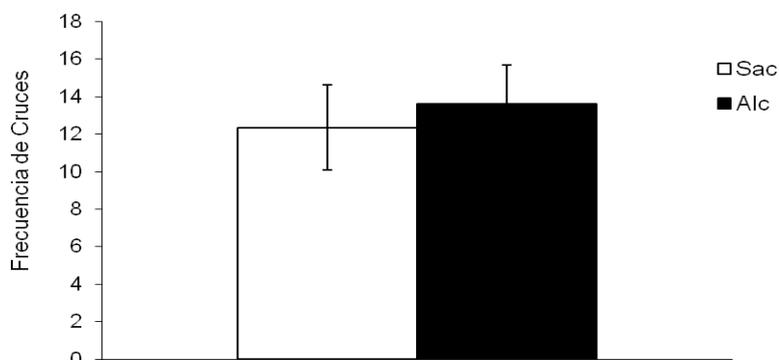


Figura 17. Frecuencia de cruces entre brazos cerrados y abiertos en la prueba de ansiedad para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc). La prueba fue de 5 minutos. Las barras indican la media \pm E.E.M.

Para analizar la latencia de desplazamiento en la prueba de ansiedad se realizó un análisis de varianza de un factor, sin observarse diferencias significativas entre grupos ($F_{(1,38)} = 2.54$, $p = 0.1$), aunque el grupo Alc mostró una tendencia a tener una latencia de inicio menor respecto al grupo Sac (Figura 18).

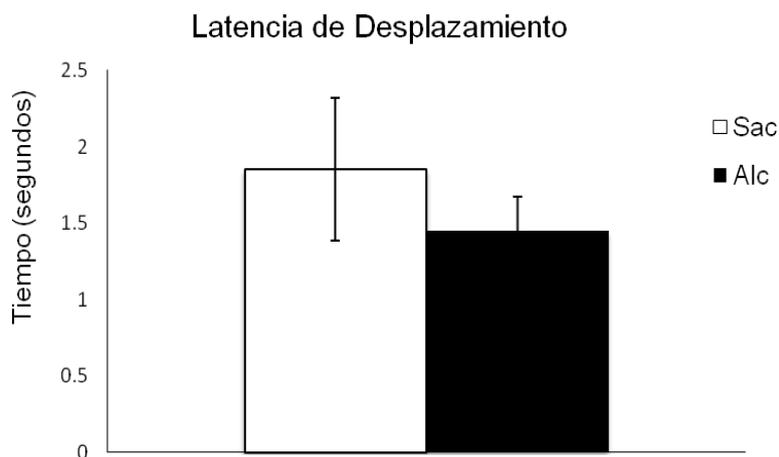


Figura 18. Latencia de desplazamiento en la prueba de ansiedad para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc). La prueba fue de 5 minutos. Las barras indican la media \pm E.E.M.

IMPULSIVIDAD

Se realizó un diseño mixto de parcelas divididas de dos factores para analizar la latencia de inicio de desplazamiento (tiempo de toma de decisión que tarda cada animal en salir de la plataforma ante cada puente de ancho novedoso), en la prueba de puente elevado. Se observaron diferencias significativas entre grupos ($F_{(1,39)} = 6.33, p = 0.01$) lo cual indicó una toma de decisión más rápida en el grupo tratado prenatalmente con alcohol; también se observaron diferencias significativas ($F_{(3,114)} = 2.93, p < 0.05$) entre los diferentes anchos de puente (2, 1, 0.5 y 0.25 cm), siendo mayor el tiempo en el puente de 2 cm respecto al de 0.5 cm; además el puente de 1 cm fue significativo respecto a 0.5 cm (figura 19).

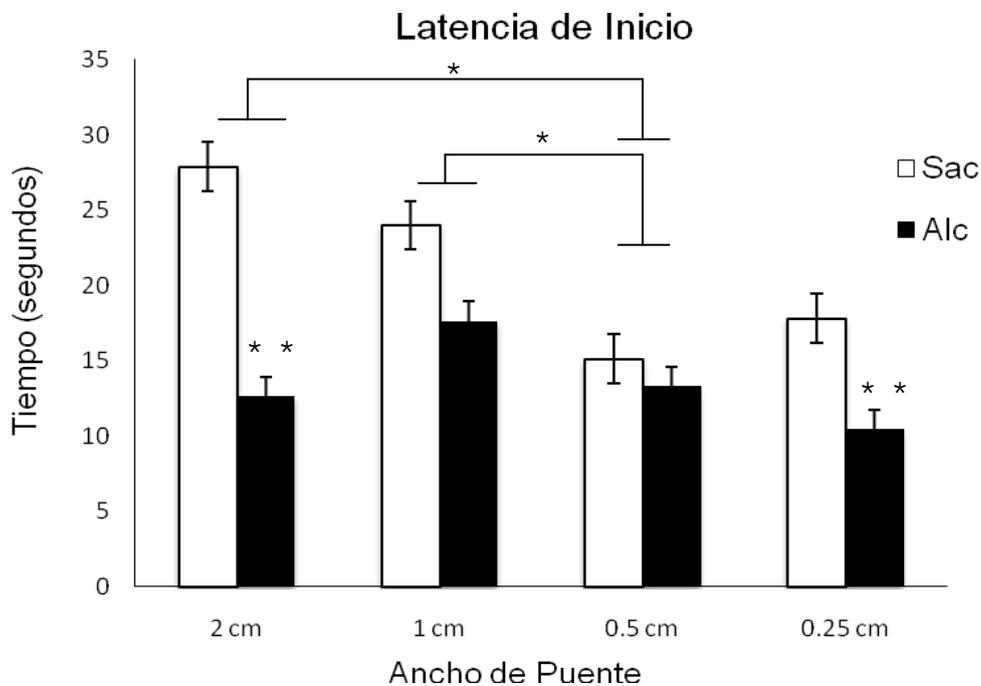


Figura 19. Tiempo de latencia de inicio para los puentes de 2, 1, 0.5 y 0.25 cm en la prueba de impulsividad para ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc). Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas entre grupos Alc < Sac (**) y ancho de puente 2 cm > 0.5 cm (*) y 1 cm > 0.5 cm.

Se realizó un diseño mixto de parcelas divididas de dos factores para analizar el tiempo total en que se realizaron los traslados en cada puente con ancho novedoso (grupo x tiempo). Se observaron diferencias significativas entre grupos ($F_{(1,38)} = 11.91, p < 0.001$), siendo menores los tiempos del grupo con tratamiento prenatal de alcohol; también se observaron diferencias significativas entre los puentes ($F_{(2,76)} = 16.09, p < 0.001$) para el puente de 1cm respecto a 0.5 cm y 0.25 cm. No se observaron diferencias en la interacción grupo por ancho de puente (Figura 20).

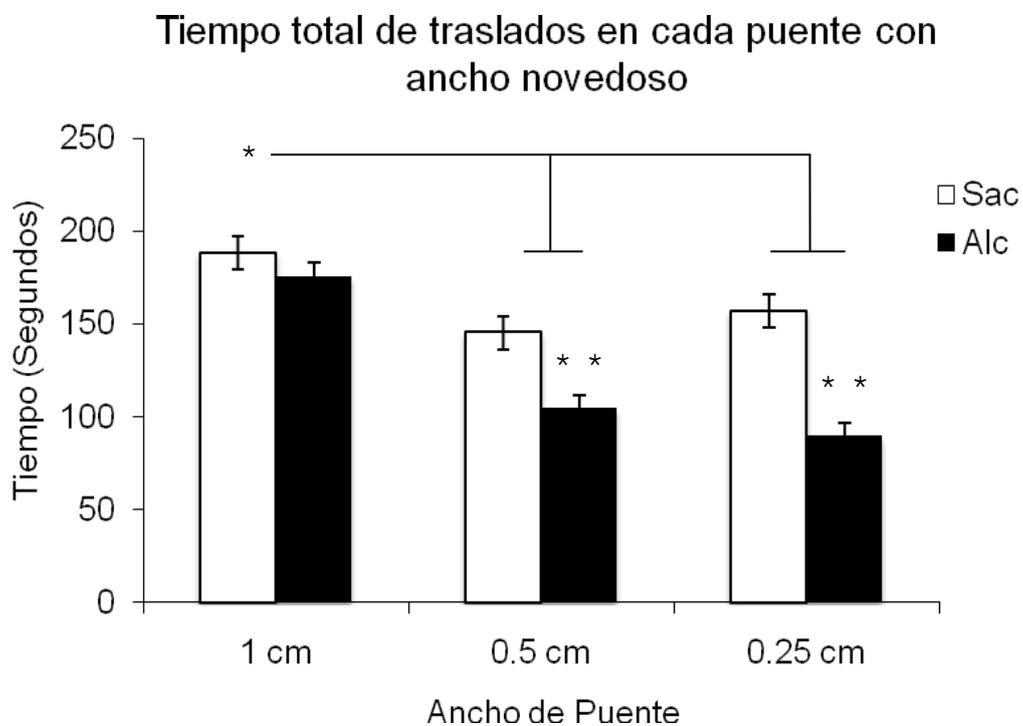


Figura 20. Tiempo total de traslados en los puentes de 1, 0.5 y 0.25 cm en la prueba de impulsividad para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc). Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas entre grupos Alc < Sac (**) y ancho de puente, 1 cm > 0.5 cm y 0.25 cm (*).

Se realizó un diseño mixto de parcelas divididas de dos factores (grupo x sesión) para analizar el parámetro de tiempo total por sesión. Se observaron diferencias significativas entre grupos ($F_{(1,38)} = 14.07, p = 0.001$); lo cual indicó que el grupo con tratamiento prenatal de alcohol completó las sesiones en menor tiempo; también se observaron diferencias significativas en las sesiones ($F_{(2,76)} = 19.88, p < 0.001$) entre la primera respecto a las dos posteriores. No hubo interacción entre el factor grupo y la sesión (Figura 21).

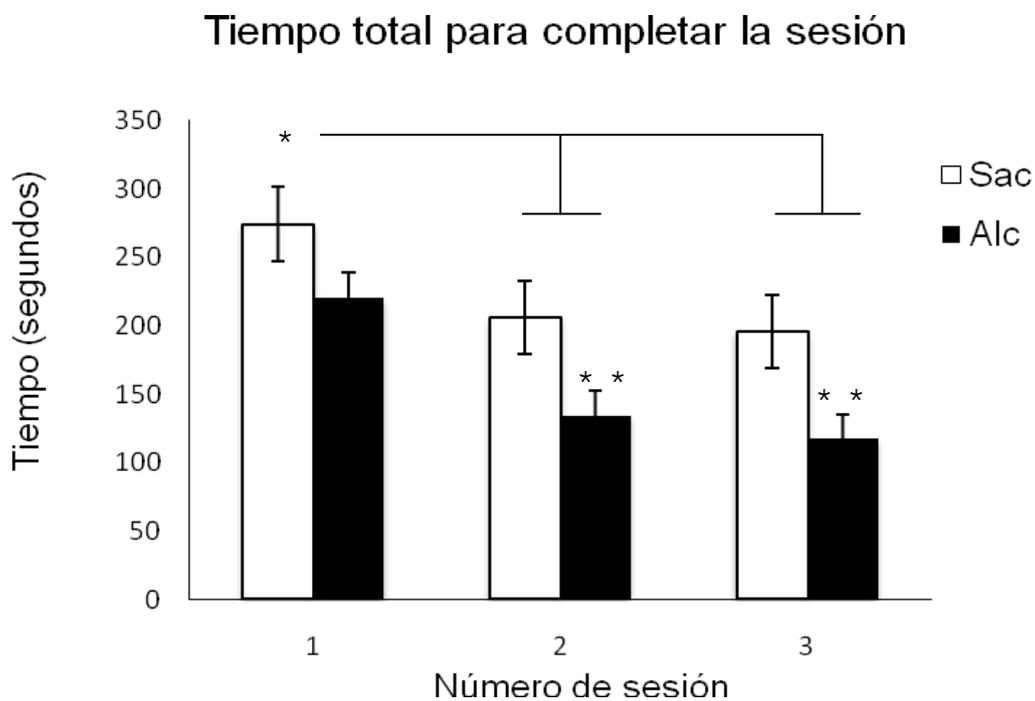


Figura 21. Tiempo total de traslados para completar la sesión en la prueba de impulsividad para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc). Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas entre grupos Alc < Sac para ese día, (**) y sesión 1 > 2 y 3 (*).

En la prueba para medir impulsividad (puente elevado), un parámetro importante para nosotros fue el porcentaje de ratas que completaban las sesiones (16 traslados) la primera vez que se exponían a los puentes. La conducta se presentó más rápidamente en las ratas con tratamiento prenatal de alcohol y suponemos que esto se debe a la impulsividad presentada por ese grupo respecto al control. En la figura 22 se muestran los porcentajes a la primera exposición (A) y a la segunda exposición (B) para las 3 sesiones.

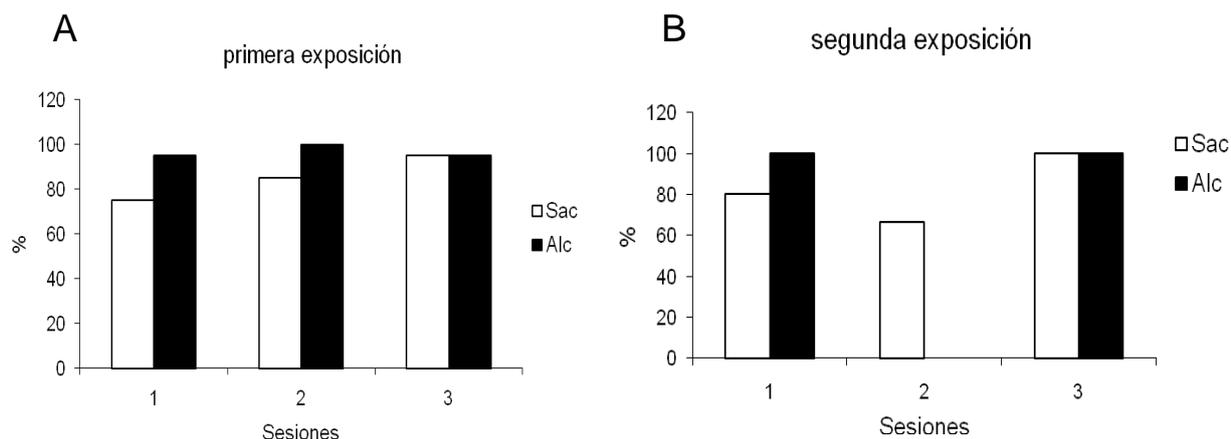


Figura 22. Porcentajes de ratas por grupo que completaron los traslados (16 por sesión) en la prueba de impulsividad para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc) **A**, primera oportunidad; **B**, segunda oportunidad.

También se muestran los porcentajes de omisiones de reforzador (cuando la rata cruzó el puente pero no se comió el reforzador), traslados incompletos (retrocesos) y caídas durante las 3 sesiones. Las ratas Sac tuvieron un número mayor de traslados incompletos respecto al grupo con tratamiento prenatal de alcohol (tabla 8).

Tabla 8. Porcentajes de omisiones, traslados incompletos y caídas en la prueba de puente elevado. Ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc).

Grupo	Traslados con omisión de reforzador			Traslados incompletos (3 días de prueba)	Caídas (3 días de prueba)
	1 cm	0.5 cm	0.25 cm		
Alc	8.3%	0%	0%	2.08%	0%
Sac	0%	0%	0%	7.40%	3.70%

GANANCIA DE PESO

Se realizó un análisis de varianza para analizar la ganancia de peso de las ratas con tratamiento prenatal (sacarosa y alcohol) las cuales recibieron una privación alimentaria contra un grupo control el cual recibió alimento *ad libitum* durante todo el experimento (día 24 a 39 EPN). Esto con la finalidad de separar el efecto de la privación alimentaria entre los grupos Sac y Alc de sus resultados en la prueba de impulsividad. El día 1 corresponde al día 21 de EPN (destete), la medición 2 y 3 se hicieron durante la prueba de campo abierto; la 4 medición corresponde a la prueba de ansiedad y a su vez al día en que se comenzó la privación alimentaria la cual finalizó en la medición 7. El día 8 de registro corresponde al día de sacrificio (39 o 40 EPN) para las ratas experimentales. Se observaron diferencias significativas entre grupos ($p < 0.001$) para los 8 días en que se midió el peso de las ratas. Las ratas que recibieron tratamiento prenatal (Sac y Alc) no mostraron diferencias significativas en la ganancia de peso respecto al grupo control (Figura 23).

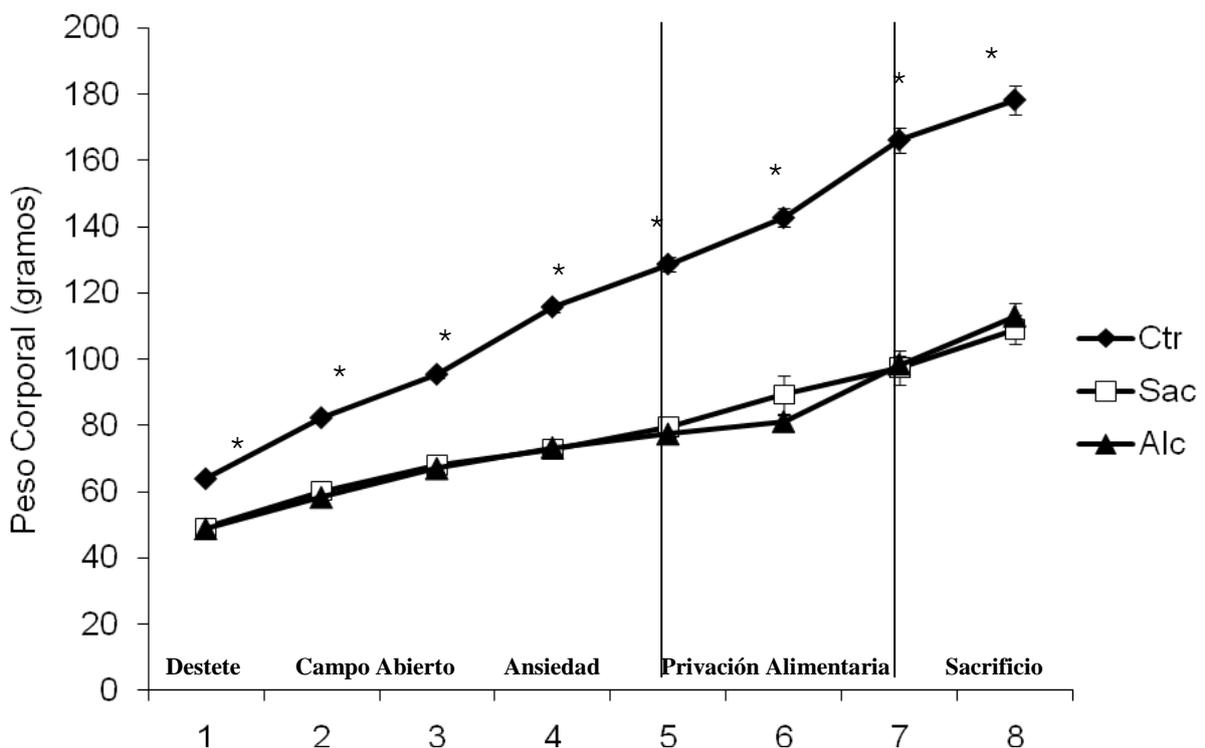


Figura 23. Ganancia de peso para ratas control (Ctr) y tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol intragástrico (Alc), del día 24 al 39 de EPN. Las líneas verticales indican el tiempo de privación alimentaria. Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas entre grupos Ctr > Sac y Alc para ese día (*).

CONDUCTA LOCOMOTRIZ TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE METILFENIDATO.

Se realizó un análisis de varianza de dos factores para analizar la actividad locomotriz (grupo x tipo de cuadrantes (centrales o periféricos)), tras la administración de MP ig en el campo abierto. No se observaron diferencias entre grupos, el tipo de cuadrantes resultó significativo ($F_{(1,54)} = 45.46$, $p < 0.01$) siendo mayor el número de cruces por cuadrantes periféricos independientemente del grupo y el tratamiento post natal (figura 25-A). Para analizar la actividad locomotriz en el cruce por cuadrantes totales se realizó un análisis de varianza de un factor (grupo x cruces) sin observarse diferencias significativas entre grupos (figura 25-B).

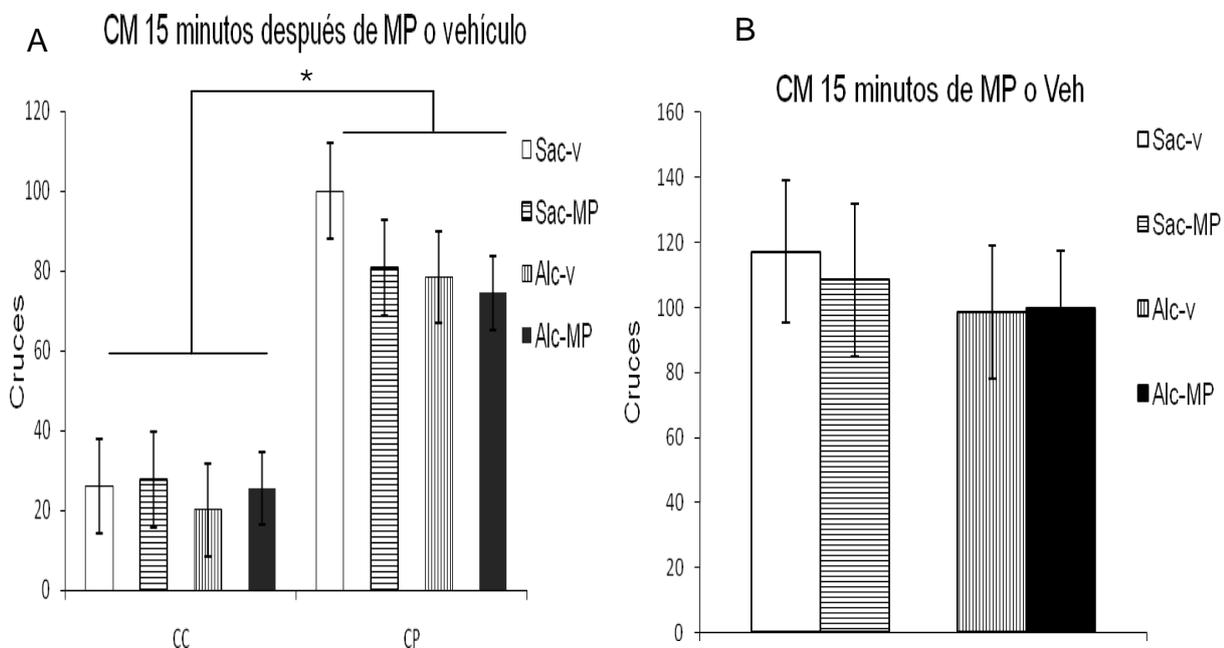


Figura 25. A: Frecuencia de cruces de cuadrantes centrales (CC) y periféricos (CP) el día de la administración de MP o vehículo de MP (39-40 EPN) en la prueba de campo abierto para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) con vehículo de MP y con MP (Sac-v y Sac-MP) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc) con vehículo de MP y con MP (Alc-v y Alc-MP). Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas para ese tipo de cuadrantes CP > CC (*). Y, **B:** cuadrantes totales (CC + CP). La prueba fue de 5 minutos.

Se realizó un análisis de varianza de dos factores (grupo x tratamiento postnatal) para analizar la conducta de tipo exploratoria (*rearing*) en el campo abierto. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($F_{(1,27)} = 4.30, p < 0.05$) siendo mayor para el tratamiento post natal (MP) (figura 26).

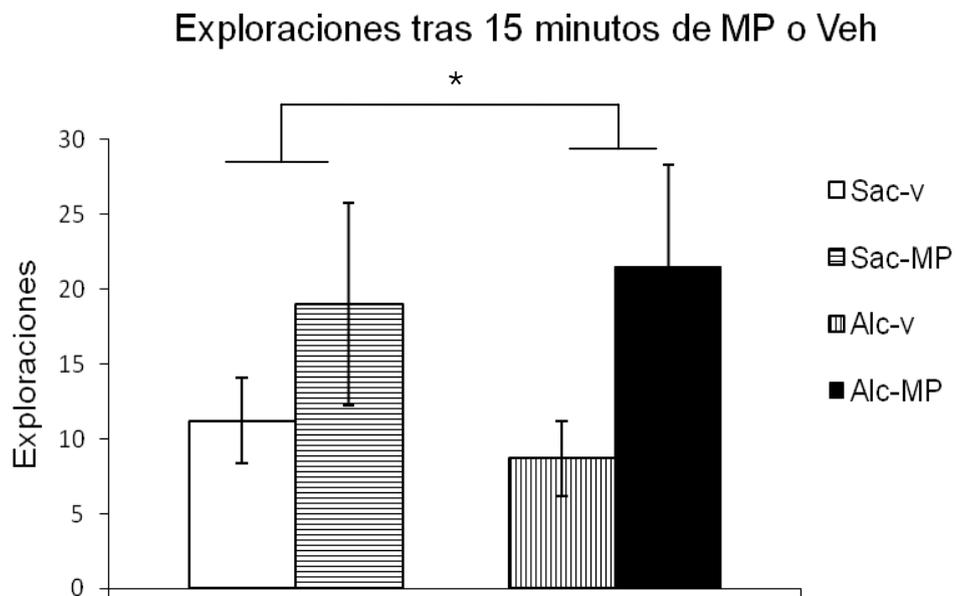


Figura 26. Frecuencia de exploraciones (*rearing*) el día de la administración de MP o vehículo de MP en la prueba de campo abierto para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) con vehículo de MP y con MP (Sac-v y Sac-MP) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc) con vehículo de MP y con MP (Alc-v y Alc-MP). La prueba fue de 5 minutos. Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas entre tratamientos MP > Vehículo (*).

ANÁLISIS DE DOPAMINA

Para el análisis de los niveles de DA en NAc se realizó un Análisis de varianza de dos factores (grupo x tratamiento prenatal). Se observaron diferencias significativas entre grupos ($F(1,36) = 7.58, p < 0.01$), lo cual indicó niveles mayores de neurotransmisor en el grupo tratado prenatalmente con alcohol respecto a su control isocalórico (figura 27).

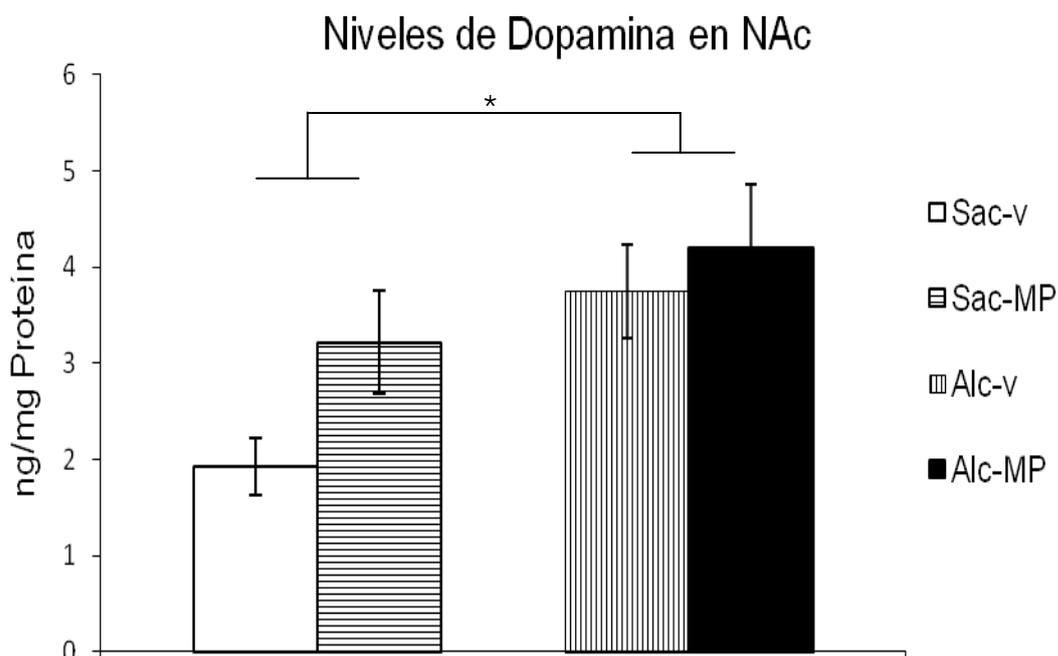


Figura 27. Concentración de DA en NAc para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) con vehículo de MP y con MP (Sac-v y Sac-MP) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc) con vehículo de MP y con MP (Alc-v y Alc-MP). Las barras indican la media \pm E.E.M. Diferencias significativas entre grupos Alc > Sac (*).

Para el análisis de los niveles de DA en CPFm Se realizó un análisis de varianza de dos factores (grupo x tratamiento). Aunque no se observaron diferencias significativas entre grupos las ratas con tratamiento prenatal de alcohol mostraron una tendencia a niveles mayores del neurotransmisor en esta estructura ($p > 0.05$), el tratamiento post natal (MP) tampoco resultó significativo (figura 28).

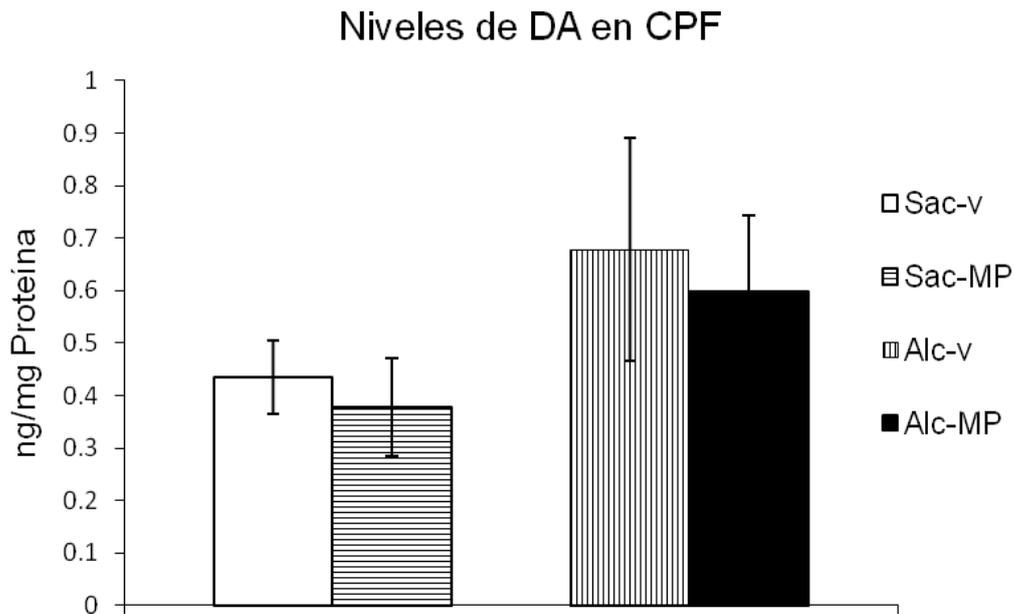


Figura 28. Concentración de DA en CPFm para las ratas tratadas prenatalmente con sacarosa intragástrica (Sac) con vehículo de MP y con MP (Sac-v y Sac-MP) y ratas tratadas prenatalmente con alcohol (Alc) con vehículo de MP y con MP (Alc-v y Alc-MP). Las barras indican la media \pm E.E.M.

DISCUSIÓN

El consumo de alcohol durante el embarazo se ha asociado con diversos trastornos conductuales en clínica y en modelos animales se sabe que afecta el sistema dopaminérgico, el cual a su vez se ha reportado estar alterado en trastornos conductuales como el TDAH (Arnsten, 2006; Feron y cols, 2005; Russel, 2006). Este trastorno se caracteriza por presentar problemas de atención, hiperactividad e impulsividad.

CONDUCTA LOCOMOTRIZ: En el presente estudio observamos que las ratas con tratamiento prenatal de alcohol presentaron una actividad locomotriz mayor respecto a las ratas control; esta actividad permaneció hasta los 10 minutos posteriores al inicio de la prueba en el campo abierto, además esta actividad locomotora incrementada permaneció los 3 días en que se midió la prueba (24, 26 y 28 EPN), siendo significativas estas diferencias entre los días 26 y 28 EPN. Lo cual indica que el tratamiento prenatal con alcohol produjo crías hiperactivas. Se conoce que el tratamiento con alcohol prenatal produce hiperactividad (Berridge y cols, 2006; Arias y cols, 2008; Tattoli y cols, 2001), lo cual concuerda con nuestros resultados. Además, se ha demostrado que el tratamiento con alcohol prenatal produce disfunción en el sistema DA mesolímbico cortical (Shen y cols, 1999; Xu & Shen, 2001; Choong & Shen, 2004; Wang & cols, 2006), y que los animales con este tipo de disfunción presentan una actividad locomotriz incrementada (Arnsten, 2006; Berridge y cols, 2006; Bizot y cols, 2007). Por otro lado, las ratas con tratamiento prenatal de alcohol presentaron un número mayor de conductas exploratorias (*rearing*) en la prueba de campo abierto observándose diferencias significativas respecto a sus controles isocalóricos, lo cual indica que además de la hiperactividad, este tipo de conducta exploratoria también es incrementada.

De igual forma, el campo abierto es utilizado en la literatura para evaluar ansiedad, ambos grupos de ratas (Alc y Sac) presentaron un número mayor de cruces por los cuadrantes periféricos respecto a los centrales y no existieron diferencias entre grupos en el cruce de tipos de cuadrantes, lo cual indica que ambos grupos tenían niveles similares de ansiedad. Este hallazgo fue apoyado por los resultados que obtuvimos en el laberinto en cruz elevado donde observamos que ambos grupos de ratas (Alc y Sac) presentaron niveles de ansiedad similares, esto es, no existieron diferencias entre la permanencia en brazos cerrados o abiertos para ambos grupos, así como la frecuencia de cruces entre brazos (cerrados y abiertos) fue igual para los dos grupos y no hubo diferencias en la latencia de desplazamiento entre grupos, aunque las ratas Alc tuvieron tiempos menores.

Una conducta que prevaleció en la prueba de laberinto en cruz elevado fue el número de exploraciones (*rearing*) que al igual que en el campo abierto las ratas Alc tuvieron una frecuencia significativamente mayor. Esto concuerda con estudios anteriores (Carneiro y cols, 2005) donde ya se había observado que el número de exploraciones y estereotipias son mayores en sujetos tratados prenatalmente con alcohol. ANSIEDAD: Algunos modelos animales han mostrado que el tratamiento con alcohol prenatal produce ansiedad además de hiperactividad, depresión y decremento en la locomoción en ambientes novedosos (Carneiro y cols, 2005), en nuestro trabajo es probable que la dosis de alcohol administrada no fuera lo suficientemente grande como para afectar significativamente los niveles de ansiedad pero si llegaron a alterar otras conductas. .

Estudios neuropsicológicos y de imagen han mostrado que el TDAH está asociado con alteraciones en la CPF y sus conexiones con el estriado. Se ha observado en modelos animales que lesiones en la CPF producen desatención, impulsividad, planeación deficiente para llegar a objetivos e hiperactividad (Arnsten, 2006). De lo anterior sugerimos que el tratamiento prenatal con alcohol produjo crías hiperactivas debido a una alteración en el sistema DA, que repercute en las proyecciones de este neurotransmisor a la CPF. La CPF es regulada por sistemas subcorticales como el noradrenérgico y el dopaminérgico (Viggiano y cols, 2004), y como ya se mencionó esta estructura es muy sensible a los niveles de catecolaminas (Arnsten, 2006). Como ya se mencionó, la exposición a alcohol prenatal (días 8 a 20) produce una afectación del sistema DA (Xu & Shen, 2001; Choong & Shen, 2004; Wang y cols, 2006), la cual puede ser normalizada tras la administración de MP. Asimismo, la alteración del sistema DA se ha asociado en clínica a trastornos conductuales como el TDAH (Arnsten, 2006; Feron y cols, 2005; Russel y cols, 2005), una patología en la que la conducta de tipo impulsiva es una de sus principales características. En nuestro estudio, el tratamiento con alcohol prenatal produjo crías hiperactivas, sin afectar sus niveles de ansiedad respecto al grupo isocalórico, también era importante para nosotros evaluar la conducta impulsiva en las ratas antes de la pubertad, etapa en la cual es mucho más probable que sea diagnosticado el TDAH en el humano.

IMPULSIVIDAD: La mayoría de los paradigmas para evaluar la conducta impulsiva en modelos animales se aplican en etapa adulta, al parecer, debido al tiempo prolongado que se requiere para entrenar a los sujetos. Por tal motivo surgió la necesidad de desarrollar una prueba que nos permitiera evaluar animales antes de llegar a la pubertad (40 EPN).

Con un nuevo paradigma, que experimentalmente probó resolver este problema, en nuestro laboratorio se desarrolló un dispositivo denominado "Puente elevado (Juárez, 2010, patente en trámite), para evaluar la impulsividad en sujetos prepúberes, esto es importante ya que se ha descrito en la literatura que ciertas conductas impulsivas sólo son presentes en edades tempranas (Bizot, 2007).

Asimismo, se ha propuesto que existen dos tipos de conducta impulsiva; una motora y otra de elección (cognoscitiva) (Arce & Santisteban, 2006; Fineberg y col, 2009; Moeller y cols, 2001; Winstanley y cols, 2005). La primera se refiere a la falta de inhibición ante una conducta preponderante y se ha relacionado con el NAc y la segunda a la toma de decisiones, involucrando en mayor medida a la CPF. En nuestra prueba, la latencia de inicio en cada puente con ancho novedoso (cuando era expuesto por primera vez el animal), se considera impulsividad motora. Así, las ratas Alc presentaron tiempos significativamente menores respecto al grupo control. En lo referente a la impulsividad de elección (o cognoscitiva), relacionada con la toma de decisiones una vez que el sujeto ya experimento el posible riesgo de cruzar un ancho de puente determinado, el tiempo total de traslados en cada puente con ancho novedoso fue indicativo de ella, observándose tiempos menores en las ratas con tratamiento prenatal de alcohol, además a medida que aumentaron las exigencias de la prueba y el tiempo en que se realizaron las sesiones (tres anchos de puentes, dos familiares y uno novedoso), fueron menores en el grupo Alc. Algo importante de señalar es que, tanto las ratas Alc como el grupo control (Sac) fueron sometidas a la misma restricción alimentaria y que la ganancia de peso en ambos grupos fue muy similar desde el momento del destete hasta su sacrificio. Esto indica que los tiempos menores observados por el grupo Alc no estuvieron influenciados por variaciones en la privación alimentaria.

De estos resultados se deduce que el tratamiento con alcohol prenatal en una dosis de 6 g/Kg del día 8 al 20 de gestación produce crías impulsivas. Desde el punto de vista neurofisiológico se ha observado en estudios en humanos y animales que la 5-HT y la DA están involucradas en la conducta impulsiva y que existe una interacción entre ambos sistemas de neurotransmisión (Arce & Santisteban, 2006; Viggiano y cols, 2004; Winstanley y cols, 2005). Por otro lado, se ha descrito que fármacos que regulan la neurotransmisión DA y NA como el MP o las anfetaminas mejoran la conducta impulsiva y se ha descrito que lesiones en el NAc incrementan los niveles de impulsividad; sin embargo, en qué medida la DA del accumbens está involucrada en la regulación del control impulsivo es desconocida (Winstanley y cols, 2005). Por otro lado, es sabido que la CPFm juega un papel importante en la regulación de ciertas funciones cognitivas y sus

conexiones con el estriado se asocian con la impulsividad, atención, toma de decisiones, actividad locomotora, entre otras (Arnsten, 2006; Devilbiss & Berridge, 2008). Con esta base, podemos sugerir que la mayor impulsividad observada en las crías que recibieron tratamiento prenatal de alcohol fue consecuencia de una afectación del sistema DA mesolímbico cortical, involucrando probablemente a ambas estructuras, NAc y CPFm. Es probable que aparte del sistema DA otros neurotransmisores se vieran afectados como la NA y la 5-HT, la medida en que estos sistemas se afectaron y el efecto en otras estructuras será objeto de estudios posteriores.

METILFENIDATO: En el caso del MP, como ya se mencionó, es el medicamento de elección en clínica para tratar la sintomatología del TDAH y aunque su mecanismo de acción no está completamente esclarecido, en la actualidad se cree que al ser el MP un agonista indirecto de la DA, aumenta la transmisión dopaminérgica en las áreas cerebrales que juegan un papel importante en aspectos cognitivos y emotivos, como lo son la CPFm y el NAc. En nuestro estudio, transcurridos 15 minutos de la administración de una dosis única de MP ig (5g/Kg BW) no observamos efectos sobre la actividad locomotriz en ambos grupos en la prueba de campo abierto respecto a sus controles. Sin embargo, en las conductas de tipo exploratorias si observamos diferencias entre el tratamiento con MP y el vehículo para ambos grupos, siendo mayor el número de exploraciones para las ratas tratadas con MP. De esto podemos concluir que conductas como las exploraciones o las estereotipias (estos resultados no se muestran) son más sensibles al efecto de una dosis de MP que la actividad locomotora. Kuczenski y colaboradores (2002) en sus trabajos describen que dosis bajas de MP disminuyen la actividad locomotora de ratas adolescentes. En nuestro estudio, las ratas Sac a las que se les administró MP tuvieron una conducta locomotora menor respecto al vehículo, en el caso de las ratas Alc, su actividad locomotora fue menor respecto al grupo Sac con y sin MP.

Es probable que la vía de administración empleada no fuera la adecuada para observar una respuesta pronta del sistema DA, si bien en la clínica el MP se administra por vía oral, en la mayoría de los estudios en que se analiza el efecto de este fármaco ya sea de manera conductual, analizando los niveles de DA o NA en alguna estructura o incluso registrando la respuesta eléctrica de las neuronas DA; el MP se administra vía ip o iv.

DOPAMINA: Tras analizar los efectos conductuales del tratamiento con alcohol prenatal expusimos a la mitad de los animales a MP ig, sacrificándolos a la media hora de la administración y evaluando los niveles de DA en nuestras estructuras de interés, la CPFm y el NAc (porción *shell*). En el caso del NAc el tratamiento con alcohol prenatal incrementó

significativamente los niveles de DA en esta estructura respecto al grupo Sac, además aunque el MP no tuvo efectos significativos las ratas que recibieron el psicoestimulante respecto a su vehículo mostraron una tendencia a niveles mayores de neurotransmisor. En CPFm, el alcohol prenatal también incrementó los niveles de DA aunque estas diferencias no fueron significativas, y en el caso del MP se observó una tendencia a la baja en los niveles de DA en esta estructura. Con base a estos resultados, el tratamiento prenatal con alcohol afectó estas estructuras, se ha descrito que lesiones en la CPF producen hiperactividad (Arnsten & Dudley, 2005; Berridge y cols, 2006; Viggiano y cols, 2004), y se ha visto que el incremento de la DA mesolímbica está relacionado con un aumento en la actividad locomotora (Ikegami y cols, 2007) lo cual concuerda con los resultados conductuales observados en nuestro estudio. .

Contrario a nuestra hipótesis el tratamiento prenatal con alcohol incrementó los niveles de DA en NAc y CPFm reflejando el efecto del alcohol prenatal sobre la vía dopaminérgica. El incremento de DA podría deberse a una regulación a la baja de los receptores D1 y D2 (Tattoli & cols, 2001), a una desensibilización de los auto-receptores, o a una sobre reactividad de las neuronas DA del ATV. El decremento en la actividad eléctrica de las neuronas DA del ATV que se ha reportado en la literatura (Xu & Shen, 2001; Choong & Shen, 2004; Wang y cols, 2006) como consecuencia del tratamiento prenatal de alcohol, al parecer no produce un decremento significativo en los niveles de DA en NAc y CPFm.

El desarrollo del SNC se puede ver afectado por diversos factores, como lo son el consumo de drogas (alcohol, cocaína, nicotina; etc.) o por estrés. Katunar y colaboradores (2010), sometieron a ratas a estrés prenatal (durante la última semana de gestación) produciendo una serie de alteraciones conductuales algunas de las cuales atribuyeron a cambios en la transmisión DA afectando significativamente al ATV. Por su parte Marsteller y colaboradores (2002) estudiaron el efecto de una administración aguda de MP (10 mg/Kg BW ip) en sujetos con estrés prenatal observando un incremento significativo en los niveles de DA en CPF respecto a los grupos de estrés sin MP y MP sin estrés. Además la ingesta de alcohol durante la gestación afecta de diferente manera a diversas estructuras cerebrales y el grado de afectación de cada área depende en gran medida del período en que se realice el consumo y de la dosis administrada; la ingesta de alcohol no sólo afecta el desarrollo del cerebro sino también la funcionalidad neuronal, lo cual indica que se alteran diversos sistemas de neurotransmisión (Ponnappa & Rubin, 2000).

Con estas bases podemos concluir que el tratamiento prenatal de alcohol produce hiperactividad e impulsividad, dos de las conductas más características de trastornos

como el TDAH, además de afectar el sistema DA mesolímbico cortical al incrementar los niveles de DA en CPFm y NAc, estructuras relacionadas con las conductas anteriormente descritas. También, la respuesta de este sistema ante un reto único de MP no afectó la actividad locomotora de los sujetos ni incrementó significativamente los niveles de DA para ambas estructuras.

El poder discriminar de una manera más adecuada el efecto del tratamiento prenatal con alcohol sobre la impulsividad cognitiva y motora, así como su alteración por el tratamiento crónico de metilfenidato con su correlato neuroquímico será motivo de estudio de futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

El tratamiento prenatal con alcohol (8 a 20 de gestación) produce crías hiperactivas e impulsivas.

El tratamiento prenatal con alcohol no incrementó los niveles de ansiedad respecto al grupo control.

El paradigma para medir impulsividad basada en la recompensa-elección permite evaluar la conducta impulsiva en ratas antes de la pubertad.

Con base en los resultados del presente estudio podemos sugerir que la dosis de MP administrada no fue la suficiente como para mostrar un efecto claro sobre la transmisión dopaminérgica en NAc y CPFm.

El incremento de DA extracelular podría deberse a una regulación a la baja de los receptores D1 y D2, a una desensibilización de los auto-receptores, o a una sobre reactividad de las neuronas DA en ATV. El decremento en la actividad eléctrica de las neuronas DA de ATV que se ha reportado, al parecer no tiene como consecuencia un decremento significativo en los niveles de DA en NAc y CPF.

El modelo con alcohol prenatal puede ser un buen candidato como modelo animal para el estudio de TDAH puesto que cumple con la validez de confrontación y con la validez de constructo.

REFERENCIAS

1. Abello LIR, Cervantes MA & Manjárez R (1990). Efectos de la administración de alcohol durante el desarrollo prenatal sobre el aprendizaje de crías de ratas. *Investigación y Desarrollo. Universidad del Norte.* 1 (1): 139-147, 1990.
2. Aloe, Luigi (2006). Alcohol intake during prenatal life affects neuroimmune mediators and brain neurogenesis. *Ann ist super Sanità* 2006, vol. 42, no. 1: 17-21.
3. Anker JJ, Gliddon LA & Carroll ME (2008). Impulsivity on a Go/No-go task for intravenous cocaine or food in male and female rats selectively bred for high and low saccharin intake. *Behavioural Pharmacology* 2008, 19:615–629.
4. Appel SB, Wise L, McDaid J, Koyama S, McElvain MA, & Brodie MS (2006). The Effects of Long Chain-Length n-Alcohols on the Firing Frequency of Dopaminergic Neurons of the Ventral Tegmental Area. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* Vol. 318, No. 3.
5. Arce E & Santisteban C (2006). Impulsivity: a review. *Psicothema* 2006. Vol. 18, nº 2, pp. 213-220.
6. Arias C, Molina, Mlewski C, Pautassi RC & Spear N (2008). Acute sensitivity and acute tolerance to ethanol in preweanling rats with or without prenatal experience with the drug. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008; 89(4): 608–622.
7. Arnsten AFT, (2006) Stimulants: Therapeutic Actions in ADHD. *Neuropsychopharmacology* 31: 2376-2383.
8. Arnsten AFT (2006). Fundamentals of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Circuits and Pathways. *J Clin Psychiatry* 2006; 67 (suppl 8).
9. Arnsten AFT & Dudley AG (2005). Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through α -2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Behavioral and Brain Functions* 2005, 1:2 doi:10.1186/1744-9081-1-2
10. Belin D, Mar AC, Dalley JW, Robbins TW & Everitt BJ (2008). High Impulsivity Predicts the Switch to Compulsive Cocaine-Taking. 2008, *Science* 320, 1352.
11. Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AFT, Kelley AE, Schmeichel B, Hamilton C & Spencer RC (2006). Methylphenidate Preferentially Increases Catecholamine Neurotransmission within the Prefrontal Cortex at Low Doses that Enhance Cognitive Function. *BIOL PSYCHIATRY* 2006;60:1111–1120.
12. Bizot JC, Chenault N, Houzé B, Herpin A, David S, Pothion S & Trovero F (2007). Methylphenidate reduces impulsive behaviour in juvenile Wistar rats, but not in adult Wistar, SHR and WKY rats. *Psychopharmacology* (2007) 193:215–223.

13. Brookes KJ, Mill J, Guindalini C, Curran S, Xu X, Knight J, Chen C-K, Huang Y-S, Sethna V, Taylor E, Chen W, Breen G & Asherson P (2006). A Common Haplotype of the Dopamine Transporter Gene Associated With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Interacting With Maternal Use of Alcohol During Pregnancy. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63:74-81.
14. Cagiano R, Cassano T, Coluccia A, Gaetani S, Giustino A, Steardo L, Tattoli M, Trabace L, & Cuomo V (2002). Genetic Factors Involved in the Effects of Developmental Low-Level Alcohol Induced Behavioral Alterations in Rats. *Neuropsychopharmacology* 26:191–203.
15. Carneiro LMV, Diogenes JPL, Vasconcelos SMM, Aragao GF, Noronha EC, Gomes PB & Viana GSB (2005). Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol. *Neurotoxicology and Teratology* 27 (2005) 585 – 592.
16. Choong K-C & Shen R-Y (2004) Methylphenidate Restores Ventral Tegmental Area Dopamine Neuron Activity in Prenatal Ethanol-Exposed Rats by Augmenting Dopamine Neurotransmission. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 309:444–451.
17. Chotro MA & Arias C (2006). Exposure to low and moderate doses of alcohol on late gestation modifies infantile response to and preference for alcohol in rats. *ANN IST SUPER SANITÀ* 2006. VOL. 42, NO. 1: 22-30.
18. Dazzi L, Seu E, Cherchil G, Barbieri PP & Matzeu A (2007). Estrous Cycle-Dependent Changes in Basal and Ethanol-Induced Activity of Cortical Dopaminergic Neurons in the Rat. *Neuropsychopharmacology* (2007) 32, 892–901.
19. Devilbiss DM & Berridge CW (2008). Cognition-Enhancing Doses of Methylphenidate Preferentially Increase Prefrontal Cortex Neuronal Responsiveness. doi:10.1016/j.biopsych.2008.04.037.
20. Dumont EC & Williams JT (2004). Noradrenaline Triggers GABA Inhibition of Bed Nucleus of the Stria Terminalis Neurons Projecting to the Ventral Tegmental Area. *The Journal of Neuroscience*, 2004, 24(38):8198–8204.
21. D'Souza MS & Duvauchelle CL (2006). Comparing nucleus accumbens and dorsal striatal dopamine responses to self-administered cocaine in naïve rats. *Neuroscience Letters* 408 (2006) 146–150.
22. Engert V & Pruessner JC (2008). Dopaminergic and Noradrenergic Contributions to Functionality in ADHD: The Role of Methylphenidate. *Current Neuropharmacology*, 2008, 6, 322-328.
23. Feron FJM, Hendriksen JGM, Kroonenburgh MJPG, Blom-Coenjaerts C, Kessels AGH, Jolles J., Weber WEJ, & Vles JSH (2005). Dopamine Transporter in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder Normalizes After Cessation of Methylphenidate. *Pediatr Neurol* 2005;33:179-183.

24. Fineberg NA, Potenza MN, Chamberlain SR, Berlin HA, Menzies L, Bechara A, Sahakian BJ, Robbins TW, Bullmore ET & Hollander E (2009). Probing Compulsive and Impulsive Behaviors, from Animal Models to Endophenotypes: A Narrative Review. *Neuropsychopharmacology* (2009), 1–14.
25. Gao M, Liu CL, Yang s, Jin GZ, Bunney BS & Shi WX (2007): Functional Coupling between the Prefrontal Cortex and Dopamine Neurons in the Ventral Tegmental Area. *The Journal of Neuroscience*, 27(20): 5414 – 5421.
26. Hausknecht KA, Acheson A, Kieres AK, Shen RY, Richards JB, & Sabol KE (2005) Prenatal alcohol exposure causes attention deficits in male rats. *Behav Neurosci* 119:302–310.
27. Ikegami A, D’Souza MS & Duvauchelle CL (2007). Experience-Dependent Effects of Cocaine Self-Administration/Conditioning on Prefrontal and Accumbens Dopamine Responses. *Behavioral Neuroscience* 2007, Vol. 121, No. 2, 389–400.
28. Ikemoto S (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev.* 2007; 56(1): 27–78.
29. Ishikawa A & Nakamura S (2006); Ventral Hippocampal Neurons, Project Axons Simultaneous to the Medial Prefrontal Cortex and Amygdala in the Rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 96: 2134 – 2138.
30. Johansen EB, Killeen PR, Russell VA, Tripp G1, Wickens JR, Tannock R, Williams J & Sagvolden T (2009). Origins of altered reinforcement effects in ADHD. *Behavioral and Brain Functions* 2009, 5:7 doi:10.1186/1744-9081-5-7.
31. Katurar MR, Saez T, Brusco M & Antonelli MC (2010), Ontogenetic Expression of Dopamine-Related Transcription Factors and Tyrosine Hydroxylase in prenatally Stressed Rats. *Neurotox Res*, DOI 10.1007/s 12640-009-9132-z.
32. Koyama S, Brodie MS, & Appel SB (2007). Ethanol Inhibition of M-Current and Ethanol-Induced Direct Excitation of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007; 97(3): 1977–1985.
33. Kuczenski R & Segal DS (2002). Exposure of Adolescent Rats to Oral Methylphenidate: Preferential Effects on Extracellular Norepinephrine and Absence of Sensitization and Cross-Sensitization to Methamphetamine. *The Journal of Neuroscience*, 2002, 22(16):7264–7271.
34. Matell MS & Portugal JS (2007). Impulsive Responding on the peak-interval procedure. *Behav Processes*. 2007 February 22; 74(2): 198–208.
35. Marsteller DA, Gerasimov MR, Schiffer WK, Geiger JM, Barnett CR, Borg JS, Scott S, Ceccarelli J, Volkow ND, Molina PE, Alexoff DL & Dewey SL (2002). Acute

Handling Stress Modulates Methylphenidate-induced Catecholamine Overflow in the Medial Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology* 2002- Vol 27, No 2

36. McFarland K, Davidge SB, Lapish CC, & Kalivas PW (2004). Limbic and Motor Circuitry Underlying Footshock-Induced Reinstatement of Cocaine-Seeking Behavior. *The Journal of Neuroscience*, February 18, 2004, 24(7):1551–1560. 1551.
37. Moeller FG, Barratt ES, Dougherty DM, Schmitz JM & Swann AC (2001). Psychiatric Aspects of Impulsivity. *Am J Psychiatry* 2001; 158:1783–1793.
38. Muñoz JA, Palau M, Salvadó B & Valls A (2006). Neurobiología del TDAH. *Acta Neurol Coloma* 2006; 22:184-189.
39. National toxicology program, US department of health and human services, ntp-cerhr expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of methylphenidate. 2005 ntp-cerhr.
40. Neese S, La Grange L, Trujillo E & Romero D (2004). The effects of ethanol and silymarin treatment during gestation on spatial working memory. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2004, 4:4
41. Neve & Neve. *The Dopamine Receptors*, 1997
42. Orduña V, Valencia-Torres L & Bouzas A (2009). DRL performance of spontaneously hypertensive rats: Dissociation of timing and inhibition of responses. *Behavioural Brain Research* 201 (2009) 158–165.
43. Paxinos G & Watson Charles; *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 7th edition. Elsevier, 2007.
44. Ponnappa BC & Rubin E (2000). Modeling Alcohol's Effects on Organs in Animal Models. *Alcohol Research & Health*. Vol. 24, No. 2, 2000.
45. Rathbun W & Druse MJ (1985). Dopamine, Serotonin, and Acid Metabolites in Brain Regions from the Developing Offspring of Ethanol-Treated Rats. 1985 International Society for Neurochemistry.
46. Riley EP & McGee (2005) *Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview with Emphasis on Changes in Brain and Behavior*. NIAAA. 1535-3702/05/2306-0357.
47. Rivalan M, Grégoire S & Dellu-Hagedorn F (2007). Reduction of impulsivity with amphetamine in an appetitive fixed consecutive number schedule with cue for optimal performance in rats. *Psychopharmacology* (2007) 192:171–182.
48. Russell VA, Oades RD, Tannock R, Killeen PR, Auerbach JG, Johansen EB & Sagvolden T (2006). Response variability in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a neuronal and glial energetics hypothesis. *Behavioral and Brain Functions* 2006, 2:30.

49. Sagvolden T, Russell VA, Aase H, Johansen EB, & Farshbaf M (2005). Rodent Models of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *BIOL PSYCHIATRY* 2005;57:1239–1247.
50. Shen RY, Hannigan JH, & Kapatos G (1999) Prenatal ethanol reduces the activity of adult midbrain dopamine neurons. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1801–1807.
51. Shen RY, Choong KC & Thompson AC. (2006). Long-term reduction in ventral tegmental area dopamine neuron population activity following repeated stimulant or ethanol treatment. *Biol Psychiatry*. 2007 Jan 1;61(1):93-100.
52. Sigh SP & Snyder AK (1982). Ethanol Ingestion during Pregnancy: Effects on Pregnant Rats and Their Offspring. The Veterans Administration, 26 May 1982. Jn.nutrition.org, 2008.
53. Tattoli M, Cagiano R, Gaetani S, Ghiglieri V, Giustino A, Mereu G, Trabace L & Cuomo V. (2001). Neurofunctional Effects of Developmental Alcohol Exposure in Alcohol-Preferring and Alcohol-Nonpreferring rats. *Neuropsychopharmacology* 2001-Vol 24, No 6.
54. Ubeda-Bañon I, Novejarque A, Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Rosa-Prieto C, Insausti R, Martinez-Garcia F, Lanuza E & Martinez-Marcos A (2007) .Projections from the posterolateral olfactory amygdala to the ventral striatum: neural basis for reinforcing properties of chemical stimuli. *BMC Neuroscience* 2007, 8:103 doi:10.1186/1471-2202-8-103.
55. Vanderschuren LJ & Kalivas PW. (2000), Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000;151(2-3):99-120.
56. Van der Kooij MA & Glennon JC (2007), Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31 (2007) 597–618.
57. Viggiano D, Ruocco LA, Arcieri S & Sadile AG (2004). Involvement of Norepinephrine in the Control of Activity and Attentive Processes in Animal Models of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Neural Plasticity*. Volumen 11, NO. 1-2, 2004.
58. Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley JS, Dewey S, Ashby C, Liebermann J, Hitzemann R & Wolf AP. Is Methylphenidate Like Cocaine?; studies on their pharmacokinetics and Distribution in the human brain. 1995.
59. Volkow ND, Fowler JS & Wang G-L (2002). Role of dopamine in drug reinforcement and addiction in humans: results from imaging studies. *Behavioural Pharmacology* 2002; 13:355-366.
60. Wang J, Haj-Dahmane S, & Shen R (2006). Effects of Prenatal Ethanol Exposure on the Excitability of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons in Vitro. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 319:857–863.

61. Wilhelm CJ, Reeves JM, Phillips TJ & Mitchell SH (2007). Mouse lines selected for alcohol consumption differ on certain measures of Impulsivity. *Alcohol Clin Exp Res*, Vol 31, No 11, 2007: pp 1839–1845
62. Winstanley CA, Theobald DEH, Dalley JW & Robbins TW. (2005) Interactions between Serotonin and Dopamine in the Control of Impulsive Choice in Rats: Therapeutic Implications for Impulse Control Disorders. *Neuropsychopharmacology* (2005) 30, 669–682.
63. Xu C & Shen RY (2001) Amphetamine normalizes the electrical activity of dopamine neurons in the ventral tegmental area following prenatal ethanol exposure. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 297: 746-752.
64. Zahm DS & Trimble M (2008). The Dopaminergic Projection System, Basal Forebrain Macrosystems, and Conditioned Stimuli. *CNS Spectr* 13:1, MBL Communications 32 January 2008.

ANEXOS

1. Tratamiento Intragástrico (Tratamiento Prenatal).

El tratamiento prenatal con alcohol intragástrico comenzó el día 8 de gestación y terminó el día 20.

Se administró una concentración de alcohol de 6 g/Kg BW en 2 tomas diarias (3 g/Kg BW cada una) con una separación de 5 horas entre sí (comenzando generalmente a las 10 de la mañana), excepto los fines de semana los cuales se administró una sola dosis de alcohol de 4 g/Kg BW.

La solución de alcohol se preparó al 20% v/v esto es, se agregaron 20 ml de alcohol etílico desnaturalizado por cada 80 ml de agua destilada.

Se sujetó a la rata por el cuello y la cola de forma que quedó inmobilizada, se le introdujo una sonda de acero inoxidable por el esófago y se le administró a flujo constante el alcohol (figura 29).

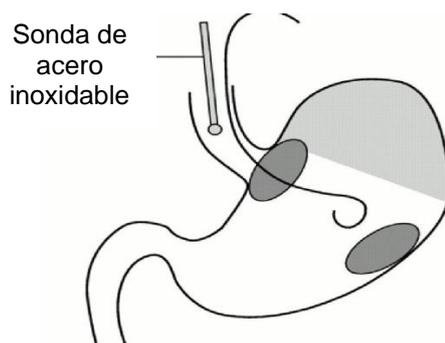


Figura 29. Administración intragástrica de alcohol durante la gestación.

2. Determinación de Catecolaminas por HPLC

PREPARACIÓN DEL TEJIDO PARA EL ANÁLISIS DE DOPAMINA

1. Disecar el tejido del área designada en nitrógeno líquido lo más rápidamente posible.
2. Depositar el tejido en un tubo Eppendorf y agregar 1 ml de 0.1 N PCA (ácido perclórico). Sonicar el tejido hasta que este se haya desintegrado totalmente.
3. Centrifugar dos veces por 20 minutos a 10,000 rpm a 4 °C.

4. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y analizar para monoaminas. Almacenar las muestras a -80 C. Evitar la congelar y descongelar el sobrenadante.
5. Remover el exceso de sobrenadante del pellet (dejando secar el tubo destapado a temperatura ambiente por 1 ó dos días). Una vez seco adicionar NaOH 0.5M y refrigerar a 4 C al menos durante una noche. Sonicar este tejido, dejar que se desaparezcan las burbujas formadas y posteriormente medir la concentración de proteínas.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Material

BSA (Bovine Serum Albumin) 0.5 mg/ml

NaCl 0.15 M

Reactivo de Bradford Diluido 1:5 (20 ml Bradford + 80 ml agua desionizada). Proteger de la luz.

Calibración de la albúmina

1. Pesar albúmina para tener una concentración final de 0.5 mg/mL. (5 mg/10 mL)
2. Leer a Abs₂₈₀, la lectura esperada para la concentración de BSA es de ~0.33
3. Hacer stocks de 0.5 ml.

Procedimiento

1. Poner en celdas de espectro fotómetro o en tubos Eppendorf BSA 0.5 mg/ml a concentración ascendente (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5).
2. Completar a 100 µL con NaCl 0.15 M
3. Adicionar reactivo de Bradford diluido.
4. Agitar en vórtex unos segundos
5. Leer a Abs₅₉₅ después de 2 minutos de incubación. No dejar pasar más de 10 minutos por que el colorante precipita lo cual afecta la lectura.
6. Para generar la curva se hacen lecturas por duplicado.
7. Muestras se leen por triplicado.