

III. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Animals d' experimentació

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

Els animals es van estabular en grups d' un màxim de 4 (rates) i de 6 (ratolins) per gàbia, en un ambient controlat amb un cicle de 12 hores de llum-fosc (llums obertes a les 07.00 h) i una temperatura ambient de 22 ± 2 °C, disposant de menjar (pinsos comercials) i aigua *ad libitum*. Els animals es mantenen sota aquestes condicions, per a permetre llur aclimatació, un mínim d' una setmana abans de la realització dels experiments. Després de realitzar la cirurgia (vegeu apartat 2.2.) els animals s' estabulen individualment i sempre que sigui possible continuen tenint lliure accés a aigua i menjar en el transcurs dels experiments. La cura i tractament dels animals es realitza segons la legislació europea de "Protecció dels Animals Utilitzats per a Experiments i Altres Propòsits Científics", d' acord amb les normes de la Unió Europea (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986).

1.2. Compostos i fàrmacs emprats

Compost/ Fàrmac	Activitat farmacològica
BAY x 3702	Agonistes 5-HT _{1A}
8-OH-DPAT	
Buspirona	
Alnespirona	
Ipsapirona	
CP 93129	Agonista 5-HT _{1B}
WAY-100635	Antagonista 5-HT _{1A}
DOI	Agonista 5-HT _{2A/2C}
M100907	Antagonista 5-HT _{2A}
SB 242084	Antagonista 5-HT _{2C}
Ritanserina	Antagonista 5-HT _{2A/2C}
EEDQ	Agent quelant de receptors acoblats a proteïna G
Toxina pertussis	Inactiva receptors acoblats a proteïna G _{i/o}
Citalopram	ISRS
Fluoxetina	
TTX	Bloqueja canals Na ⁺
Cirazolina	Agonista α_1
Prazosin	Antagonista α_1

Compost/ Fàrmac	Activitat farmacològica
S-AMPA	Agonista AMPA/KA
NBQX	Antagonista AMPA/KA
MK-801	Antagonistes NMDA
PCP	
Ketamina	
1S,3S-ACPD	Agonista mGluR II/III
Bicucul.lina	Antagonista GABA _A
Haloperidol	Antipsicòtics clàssics
Clorpromacina	
Clozapina	Antipsicòtics atípics
Olanzapina	
Racloprida	Antagonista D ₂ /D ₃
Reboxetina	ISRN
Diazepam	Agonista benzodiazepínic (GABA _A)

Taula 2. Compostos i fàrmacs emprats i la seva activitat farmacològica.

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

2. MÈTODES

MICRODIÀLISI INTRACEREBRAL *IN VIVO*

2.1. Construcció de les sondes de diàlisi

La construcció de les sondes concèntriques de diàlisi està abastament descrita en treballs del nostre laboratori. La seva fabricació i ús per a rata s'ha realitzat segons la descripció actualitzada d'Adell i Artigas (1998). S'ha posat a punt, però, la tècnica per a ratolins i així s'han adaptat les sondes de les descrites per rata en funció de la diferència de grandària existent entre les dues espècies.

El cos de la sonda està format per un tub d'acer inoxidable de 25 G (0.51 mm DE, 0.30 mm DI) (A-M Systems, Carlsborg, WA, EUA) de 15 mm de longitud (en rata, 20 mm). En aquest tub s'inserten dos tubs de sílica capil·lar fosa de 0.11 mm DE, 0.04 mm DI (Composite Metal Services Ltd, The Chase, Hallow, Regne Unit). A continuació es posen uns altres dos tubs d'acer inoxidable de 27 G (0.41 mm DE, 0.20 mm DI) (A-M Systems) de 7 mm de longitud a l'extrem superior dels dos capil·lars de sílica fosa. La unió dels tubs d'acer de 25 i 27 G es segella amb una barreja d'AralditTM, Ciba-Geigy. Es deixa assecar i es recobreix amb ciment dental KerrTM TAB 2000 per a endurir l'ensamblatge. Posteriorment, es connecta a cadascun dels dos tubs d'acer de 27 G un tub de polietilè (0.61 mm DE, 0.28 mm DI) (Portex Ltd., Hythe, Kent, Regne Unit) per a facilitar la connexió de la sonda a la bomba de perfusió. Per a fixar els tubs de polietilè als tubs d'acer es posa una capa de plàstic termofusible al voltant de l'estructura. Finalment, es talla el tub de sílica fosa a la mida que convingui segons la regió cerebral a estudiar i s'hi introdueix la membrana de diàlisi Cuprophan (Gambro, Lund, Suècia) fins a l'interior del tub de 25 G. La membrana consisteix en una fibra buida de cel·lulosa regenerada (0.25 mm DE, 0.22 mm DI) amb una mida de porus que permeti el pas de molècules d'un pes molecular inferior a 5000 daltons. Tant l'extrem de la membrana com la zona d'unió al tub d'acer són segellades amb LoctiteTM gel.

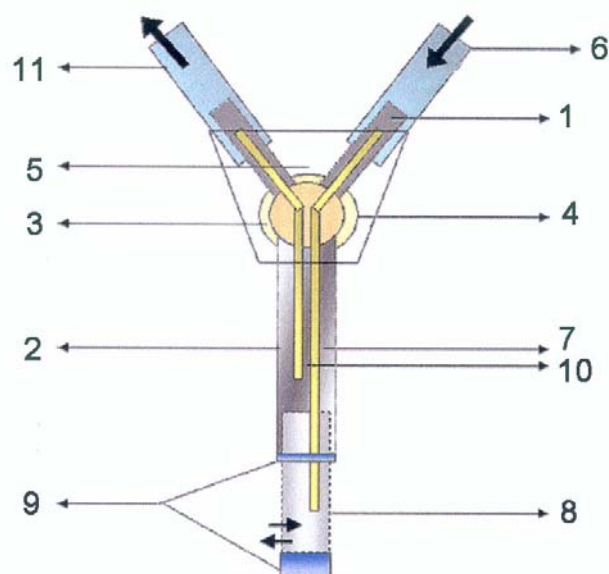


Figura 8. Esquema d'una sonda de microdiàlisi. La sonda està constituïda per uns tubs d'acer inoxidable, dos de curts de 27 G (1) i un de més llarg de 25 G (2); la unió d'aquests tres està segellada amb AralditTM (3) i protegida per ciment dental KerrTM TAB 2000 (4) i per un plàstic termofusible (5). El líquid de perfusió entra per un tub de polietilè (6) i passa per un tub de sílica capil·lar fosa (7) fins arribar a la zona d'intercanvi, on hi ha la membrana de diàlisi (8), l'extrem de la qual juntament amb la zona d'unió al tub d'acer estan segellades amb LoctiteTM gel (9). El dialitzat entra per un altre tub de sílica capil·lar fosa més curta (10) i surt per l'altre tub de polietilè (11) que porta fins a un vial per al seu posterior processament.

2.2. Implantació de les sondes de diàlisi

La sonda de diàlisi s'implanta estereotàxicament (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) a la regió d'interès del cervell de la rata o ratolí (figura 9) prèviament anestesiats amb pentobarbital sòdic (60 i 40 mg/kg, i.p., respectivament). Les coordenades estereotàxiques on s'implanten les sondes es calculen segons l'atlas de l'anatomia del cervell de rata de Paxinos i Watson (1986) i de ratolí de Franklin i Paxinos (1997), prenent bregma com a referència per a la coordenada antero-posterior (AP) i la lateral (L), així com la duramàter per a la dorso-ventral (DV) en rata. En el cas del ratolí la coordenada dorso-ventral es calcula a partir de la superfície de l'os del crani. La taula 3 il·lustra les coordenades de les regions estudiades de rata i ratolí (*en cursiva*) on s'han implantat les sondes de diàlisi, i la

corresponent longitud de la superfície activa de les membranes de diàlisi segons la zona diana i l'espècie.

	Longitud	Antero-posterior	Lateral	Dorso-ventral
Escorça prefrontal medial (EPFm)	4.0	+ 3.2	- 0.8	- 6.0
	<i>2.0</i>	+ 2.2	- 0.2	- 3.4
Tàlem (MD+CM)	1.5	- 3.5	- 0.5	- 6.5
Nucli dorsal del rafe (NDR)	1.5	- 7.4	- 3.1	- 7.5 ^(a)
	<i>1.0</i>	- 4.5	- 1.0	- 4.4 ^(b)

Taula 3. Longitud de la membrana de diàlisi segons la regió cerebral i coordenades estereotàxiques (AP i L, respecte bregma; DV, des de duramàter en rata o des de la superfície de l'os en ratolí) segons l'atlas d'en Paxinos i Watson (1986) i d'en Franklin i Paxinos (1997) per rata i per ratolí (*en cursiva*), respectivament. En el nucli dorsal del rafe les sondes s'han implantat amb un angle lateral de 30° (a) o de 20° (b), per a evitar l'obstrucció de l'aqüeducte cerebral. Tots els valors s'expressen en mm.

Un cop l'animal està col·locat a l'aparell estereotàxic (fig. 9A), es practica una incisió longitudinal amb un bisturí (fig. 9B). Prenem la mesura de bregma, es calculen les coordenades de l'àrea o àrees (doble sonda) d'interès i es perfora el crani amb una broca sense trencar la duramàter (fig. 9C). Tot seguit es realitzen tres (rata) o dos (ratolí) forats més en el crani al voltant del forat/s (implant d'una o dos sondes) existent/s (fig. 9D) on es col·loquen uns cargols (Microbiotech/se AB, Estocolm, Suècia) que serveixen per anclar la sonda. Després de l'obtenció de la coordenada dorso-ventral, introduïm la sonda al teixit cerebral previ trencament de la duramàter (fig. 9E i 9F), ja que ens podria malmetre la sonda. Finalment, es posa una base de ciment dental KerrTM TAB 2000, que permet fixar la sonda amb els cargols al crani de l'animal i dóna rigidesa i protecció a l'ensamblatge (fig. 9G i 9H).

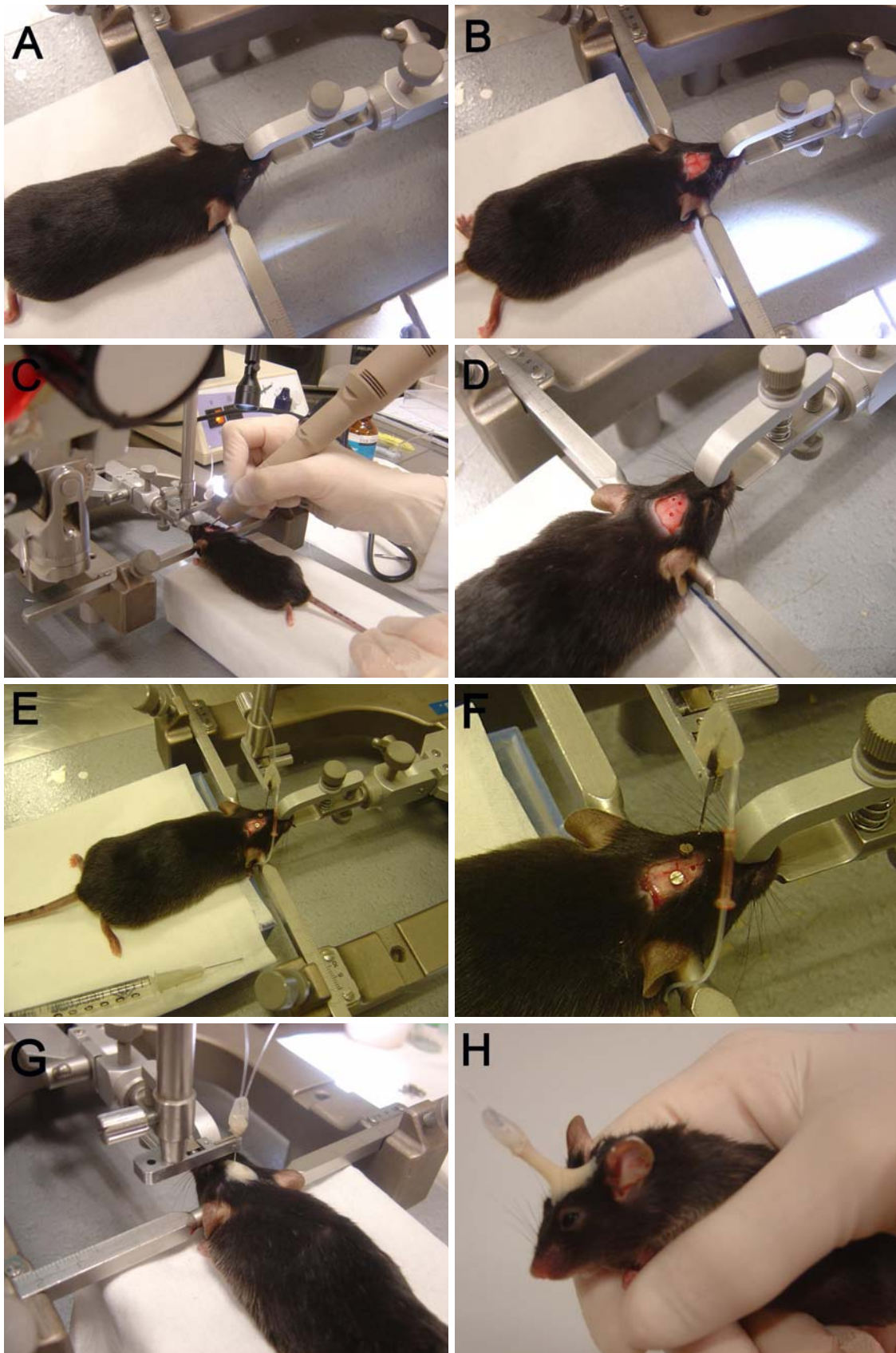


Figura 9. Procés d' implant d' una sonda de microdiàlisi en ratolí.

S' ha implantat la sonda en el NDR en ratolins per primera vegada (treball 3) i hem realitzat un estudi molt acurat de la localització de la sonda en talls coronals per tal de confirmar que les coordenades i l' angle lateral de 20° escollits són els correctes.

2.3. Obtenció de mostres de dialitzat cerebral

A continuació de realitzar l' implant de la sonda de diàlisi es deixa transcórrer aproximadament unes 20 hores, abans d' iniciar els experiments, per tal de facilitar la recuperació de l' animal i la conseqüent estabilització de les concentracions de neurotransmissors. D' aquesta manera, podem considerar que la 5-HT procedeix d' alliberament neuronal, i no de neurones trencades i/o plaquetes agregades a la zona de la lesió (ja que pot haver-hi trencament de vasos sanguinis). L' origen neuronal de la 5-HT de les mostres de dialitzat es pot posar de manifest per diferents tipus de manipulacions que afecten l' alliberament d' aquesta amina, com ara: addició de TTX, omissió d' ions Ca^{2+} al líquid de perfusió, o l' administració d' agonistes 5-HT_{1A}. Totes aquestes estratègies redueixen la freqüència de transmissió d' impulsos nerviosos al llarg dels axons serotoninèrgics i conseqüentment es produeix una reducció de l' alliberació del neurotransmissor (Auerbach *et al.*, 1989; Sharp *et al.*, 1990). S' ha observat que la concentració extracel·lular de 5-HT és anormalment alta durant les primeres hores després de l' implant de la sonda (fins a 10 vegades la concentració basal que s' aconsegueix després d' haver transcorregut un mínim de 7-8 hores des de l' implant) (Kalén *et al.*, 1988).

Les sondes, transcorregudes aquestes 20 hores, es perfonen amb líquid cèfalo-raquidi (LCR) artificial, la composició del qual és la següent: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.18 mM MgCl₂, 1.26 mM CaCl₂, el pH resultant d' aquesta solució és de 6.5. Un dels aspectes crucials dels estudis de microdiàlisi és la composició del líquid de perfusió, que ha de ser fisiològica i isotònica respecte a la del líquid de l' espai intersticial. Un dels problemes més comuns inherent a la majoria dels estudis de microdiàlisi és la baixa concentració de neurotransmissors en l' espai extracel·lular a causa dels eficients mecanismes de recaptació pels seus transportadors i/o inactivació metabòlica. Per tal de vèncer aquesta complicació en la majoria dels estudis realitzats s' ha inclòs un bloquejador del transportador de 5-HT, (ISRS),

citalopram, a una concentració d' 1 μM en el líquid de perfusió. En absència de citalopram, la concentració extracel·lular de 5-HT reflecteix el balanç entre el procés d' alliberament i captació (Adell *et al.*, 1991), mentre que, en presència de citalopram, es mesura majoritàriament el component d' alliberament, que és l' objecte d' interès del present treball.

El LCR artificial es perfora mitjançant una bomba de perfusió (Harvard Apparatus Syringe infusion Pump 22, EUA) a un flux d' 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$. La xeringa es connecta a un tub de polietilè de 0.61 mm DE i 0.28 mm DI (Portex Ltd, Hythe, Kent, Regne Unit), que condueix a un sistema de connexió giratòria, el *swivel* (Instech Laboratories, Plymouth Meeting PA, EUA), que permet a la rata o al ratolí moure's lliurement per la gàbia sense que el sistema es desconnecti. Al *swivel* s' hi connecta un tub de polietilè de 0.12 mm de DI (Microbiotech) que es fixa al tub d' entrada de la sonda. Al tub de sortida de la sonda es connecta un altre tub idèntic a l' anterior que porta a un vial on es recull la mostra del dialitzat (tubs de polietilè amb tap de 250 μl , Elkay Products Inc., Shrewsbury, MA, EUA). Les connexions entre tubs, i entre aquests i el *swivel*, es realitzen mitjançant uns tubs adaptadors (CMA).

En els experiments de diàlisi en rata anestesiada la dosi inicial d' hidrat de cloral és de 400 mg/kg i.p. i les dosis addicionals són de 40 mg/kg i.p.

Una vegada tenim el sistema amb els tubs plens del líquid de perfusió, es deixa de 30 a 50 minuts d' estabilització a partir dels quals comença la recollida de mostres cada 20 minuts. El volum que es recull és per tant, de 30 μl per cada fracció. Després de la fase d' estabilització es recullen 6 fraccions de les quals n' utilitzem 4 per al càlcul dels valors basals d' alliberament. A partir de la sisena fracció s' inicia la fase de tractament, en la qual s' administra el fàrmac, bé de forma sistèmica (subcutàniament o intraperitonealment) o bé de forma local, diluït en el líquid de perfusió.

La figura 10 mostra dues fotografies de rata i ratolí, respectivament, durant la fase de recollida de mostres en diàlisi amb animal despert.

Els components neuroquímics que s' analitzen de les mostres de diàlisi són bàsicament la 5-HT i el seu metabòlit, el 5-HIAA. En determinats experiments s' ha mesurat també les catecolamines; DA, i el seu metabòlit, l' àcid 3,4-dihidroxifenilacètic (DOPAC), i la NA. Per tal d' evitar la ràpida degradació de les catecolamines hem afegit als vials de recollida de mostra 5 μl d' àcid perclòric 0.01M.

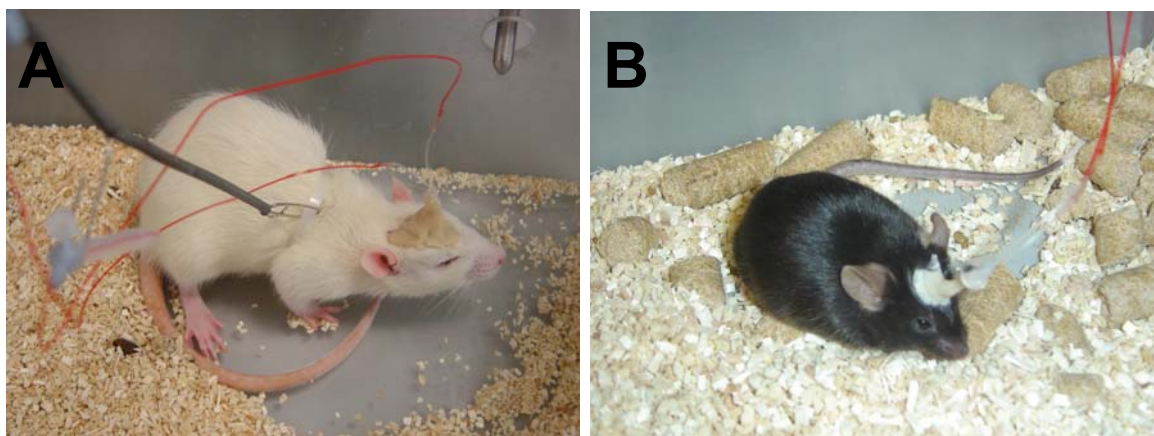


Figura 10. Rata (A) i ratolí (B) durant l' experiment de microdiàlisi.

2.4. Administració de fàrmacs

2.4.1. Administració local

Els fàrmacs es dissolen en el líquid de perfusió (excepte clozapina, olanzapina i M100907 en medi àcid i, prazosin i haloperidol en aigua destil·lada), i es dilueixen fins a les concentracions adequades en LCR artificial. Les solucions concentrades (1mM) s'ajusten a pH 6.5-7 amb NaHCO_3 en el cas que sigui necessari, es conserven a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ i les solucions de treball es preparen diàriament, a excepció d'aquelles que per tal de mantenir la seva estabilitat hagi estat necessària la seva preparació en el moment de l' experiment. Habitualment, una vegada obtinguts uns valors basals estables, el líquid de perfusió (LCR artificial amb o sense citalopram segons les condicions de l' experiment) es substitueix per un altre que conté el fàrmac que es vol estudiar per un període de 2 hores i tot seguit s'administra l'esmentat fàrmac juntament amb altres compostos d'interès per un altre període de 2 hores. Aquesta metodologia és particularment útil quan es volen valorar diferències regionals dels efectes de determinats fàrmacs o quan es volen examinar els efectes de substàncies que no poden passar la barrera hemato-encefàlica.

D'altra banda, l'implant d'una segona sonda de diàlisi permet observar canvis en les concentracions de neurotransmissors tant localment com distalment respecte al lloc d'infusió del fàrmac. Aquesta aproximació ens permet estudiar l'existència de relacions anatòmiques i funcionals entre dues regions del cervell.

Els canvis en la concentració de neurotransmissor a una àrea cerebral després de l'administració sistèmica d'un fàrmac no es corresponen necessàriament amb els produïts per la seva aplicació local. En general, quan s'aplica un fàrmac de manera local (l'efecte es limita al teixit circumdant) es necessiten concentracions molt elevades d'aquest per a tenir efectes similars als sistèmics a causa de la millor distribució del fàrmac pels capil·lars cerebrals quan s'administra per via sistèmica.

Cal tenir en compte també que les concentracions efectives administrades per microdiàlisi reversa per estimular/bloquejar receptors o transportadors del cervell difereixen d'uns 3-4 ordres de magnitud respecte les seves afinitats *in vitro*. Així s'ha vist que 100 μ M WAY-100635 (diluint amb 100 nM tritiat) marca molt poc el NDR (Celada *et al.*, 2001). Hi ha també treballs d'electrofisiologia on es necessita aplicar 10^{-4} M, és a dir de l'ordre de 100 μ M, per activar receptors (Sakai i Crochet, 2001; West i Grace, 2002).

Aquesta diferència, en la microdiàlisi, és deguda principalment als baixos fluxos utilitzats, juntament amb el constant aclariment que pateixen els fàrmacs administrats a través dels capil·lars cerebrals i del LCR de manera que només una petita fracció del fàrmac arriba als receptors diana. Aquest factor és especialment important en el treball 4 on l'efecte de la cirazolina sobre l'alliberament de 5-HT requereix l'estimulació d'una gran població de receptors en les neurones corticals de projecció al NDR per tal d'obtenir un increment mesurable de l'alliberació de 5-HT terminal. També en el treball 5 on es desinhibeixen les aferències excitadores del tàlem a l'EPFm i examinem els efectes en l'alliberament distal de 5-HT. També estudiem la modulació d'aquests efectes sobre l'alliberament de 5-HT prefrontal per diferents fàrmacs administrats tant localment a través de la sonda situada a l'EPFm com de manera sistèmica.

2.4.2. Administració sistèmica aguda

Els fàrmacs subministrats sistèmicament s'han dissolt en salí (NaCl 0.9%) a excepció de fluoxetina i prazosin dissolts en aigua destil·lada, i clozapina i olanzapina en medi àcid (vegeu apartat 2.4.1.), i s'han administrat intraperitonealment (i.p.) o subcutàniament (s.c.) (veure treballs 1, 3, 5 i 6).

2.4.3. Administració sistèmica crònica

L'administració crònica dels fàrmacs (treball 7) es realitza mitjançant la implantació de minibombes osmòtiques (Alzet™ model 2002, ALZA corporation, Palo Alto, CA, EUA). Les minibombes es col·loquen subcutàniament a nivell escapular després d'anestèsiar els animals amb hidrat de cloral (400 mg/kg, i.p.). En el dia 13 (considerem el dia 0, el dia de la col·locació de les minibombes) s'opera l'animal prèvia anestèsia amb pentobarbital sòdic; implantem una sonda de microdiàlisi a la regió d'interès, en el nostre cas l'EPFm. Donat l'increment de pes de les rates durant aquest període de temps, la dosi de fàrmac es calcula en funció del pes de l'animal en el dia 7 del tractament, considerant un augment de pes de 7 grams per dia. Les bombes s'omplen amb una solució de fluoxetina que allibera la quantitat de 3 mg/kg/dia. En el dia 14 del tractament realitzem la tècnica de microdiàlisi intracerebral (avaluem 5-HT, DA i NA) i administrem olanzapina 3 mg/kg s.c. als animals per tal d'estudiar l'efecte de l'olanzapina sistèmica sobre l'alliberament d'aquests tres neurotransmissors en rates tractades 14 dies amb fluoxetina. Les minibombes dels animals control contenen dimetil sulfòxid (DMSO) al 50% en aigua destil·lada, vehicle en el que s'ha dissolt la fluoxetina.

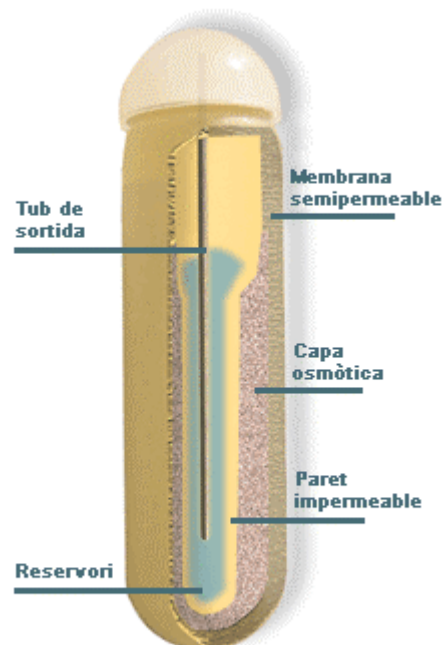


Figura 11. Esquema d'un tall transversal d'una minibomba osmòtica amb els seus compartiments.

Les propietats de les minibombes són les següents:

- flux: $0.49 \pm 0.02 \mu\text{l/h}$
- capacitat: $235 \pm 5.6 \mu\text{l}$

2.5. Inactivació dels receptors 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} de rata

Per tal d' examinar la interacció cortical dels receptors 5-HT_{2A} i 5-HT_{1A} s' han emprat dues estratègies experimentals diferents (treball 1). En primer lloc, la funció del receptor 5-HT_{1A} a l' EPFm de rata s' ha inactivat mitjançant l' aplicació local de la toxina pertussis que ribosila les proteïnes G_{i/o}, desacoblant així la proteïna G del receptor. La toxina s' infon ($1\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ de LCR) estereotàxicament en rata anestesiada a través d' una cànula (tub d' acer de 25 G) a dues coordenades DV diferents: -3.0 i -5.0 mm, mantenint les mateixes coordenades AP i L de la sonda de diàlisi, és a dir, +3.2 i -0.8, respectivament. A cada punt d' aplicació la solució de la toxina es distribueix durant 2 minuts gràcies a una xeringa Hamilton connectada a una bomba d' infusió i la sonda es deixa aproximadament uns 15 minuts abans de retirar-la perquè la solució difongui correctament. Els experiments de microdiàlisi es realitzen 2-3 dies després de l' administració de la toxina en animal en lliure moviment. En les rates dialitzades 2 dies més tard, la sonda de diàlisi s' implanta 1 hora després de l' aplicació de la toxina pertussis. Ara bé, en les rates examinades 3 dies després, les sondes s' implanten el dia abans dels experiments de microdiàlisi, és a dir, 2 dies després de l' administració de la toxina per tal d' evitar una possible reacció excessiva de gliosi conseqüència de l' implant de la sonda durant tres dies.

Una segona estratègia per estudiar la participació d' aquests dos receptors ha estat l' administració de l' agent quelant EEDQ que s' uneix irreversiblement als receptors acoblats a proteïna G (com ara 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}). Per tal de protegir selectivament cada subtipus de receptor 5-HT_{2A} o 5-HT_{1A} de l' efecte de l' EEDQ hem seguit la següent metodologia utilitzada prèviament *in vitro* (Gozlan *et al.*, 1994) però realitzada per primer cop *in vivo* en el treball 1 de la present tesi. Unes 3-4 hores després de l' implant de la sonda de microdiàlisi a l' EPFm, es va perfondre les sondes amb l' antagonista 5-HT_{2A/2C} ritanserina ($300 \mu\text{M}$) durant 3 hores al flux de treball. Una hora després de l' inici de la perfusió, l' EEDQ (dissolt 1:1 en etanol: aigua) va ser administrat a les rates (6 mg/kg , i.p.). D' aquesta manera la prèvia

ocupació dels receptors 5-HT_{2A} per la ritanserina evitaria la inactivació del receptor per l' EEDQ a la zona mostrejada per la sonda. Igualment, s' ha seguit el mateix procediment per tal de protegir els receptors 5-HT_{1A}, però en aquest cas s' ha aplicat l' antagonista selectiu 5-HT_{1A}, WAY 100635, abans de l' administració de l' EEDQ. Els experiments de diàlisi es realitzen 24 hores després.

2.6. Model de desinhibició talàmica

Per tal de desinhibir les aferències excitadores talàmiques a l' EPFm, hem emprat la tècnica de microdiàlisi de doble sonda en rata anestesiada amb hidrat de cloral; una sonda ha estat implantada a l' EPFm i l' altra a la regió talàmica que conté els nuclis centromedial (CM) i mediodorsal (MD) (vegeu apartat 2.2.). La desinhibició es realitza mitjançant la perfusió de l' antagonista GABA_A bicucul.lina (1mM) al flux de treball a través de la sonda implantada al tàlem i s' analitzen els efectes distals sobre l' alliberació de 5-HT a l' EPFm (Puig *et al.*, 2003). Cal tenir present que el tàlem està tònicament inhibït per la innervació GABAèrgica procedent de la substància nigra reticulata i d' aquesta manera la bicucul.lina és capaç d' eliminar el fre endogen que tenen aquestes neurones talàmiques produint, per tant, un increment de la transmissió glutamatèrgica a zones de terminació com l' EPFm. També hem examinat la modulació d' aquests efectes en l' alliberació prefrontal de 5-HT tant per fàrmacs administrats sistèmicament com aplicats a través de la sonda situada a l' EPFm.

2.7. Comprovació de la localització de la sonda de diàlisi

Una vegada s' ha acabat l' experiment es procedeix al sacrifici de l' animal mitjançant una sobredosi de pentobarbital sòdic. Tot seguit es perfon una solució del colorant Fast Green (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) a través de la sonda amb la finalitat que tenyeixi al voltant de l' àrea on s' ha implantat. Després d' uns minuts s' extreu el cervell i es congela a -20 °C. Un cop congelat, es realitzen una sèrie de talls coronals amb un bisturí fins trobar la marca del colorant (inspecció visual de la regió).

En d'altres casos (treballs 2 i 3), per a una millor observació de la localització de les sondes (figura 12), els ratolins s'han perfós amb solució salina al 0.9% i després amb una solució de formalina al 10% (Sigma). Inmediatament s'extreu cada cervell, es congela a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ i després es realitzen talls coronals de $50\text{ }\mu\text{m}$ mitjançant un criòstat. Posteriorment cadascuna de les seccions es tenyeix amb Neutral Red (Sigma) segons un protocol estandarditzat i finalment, s'observen les seccions tenyides al microscopi òptic.

Verificada la localització, aquells animals en els que la sonda no està situada a la regió d'interès són descartats en el moment de realitzar l'anàlisi dels resultats.

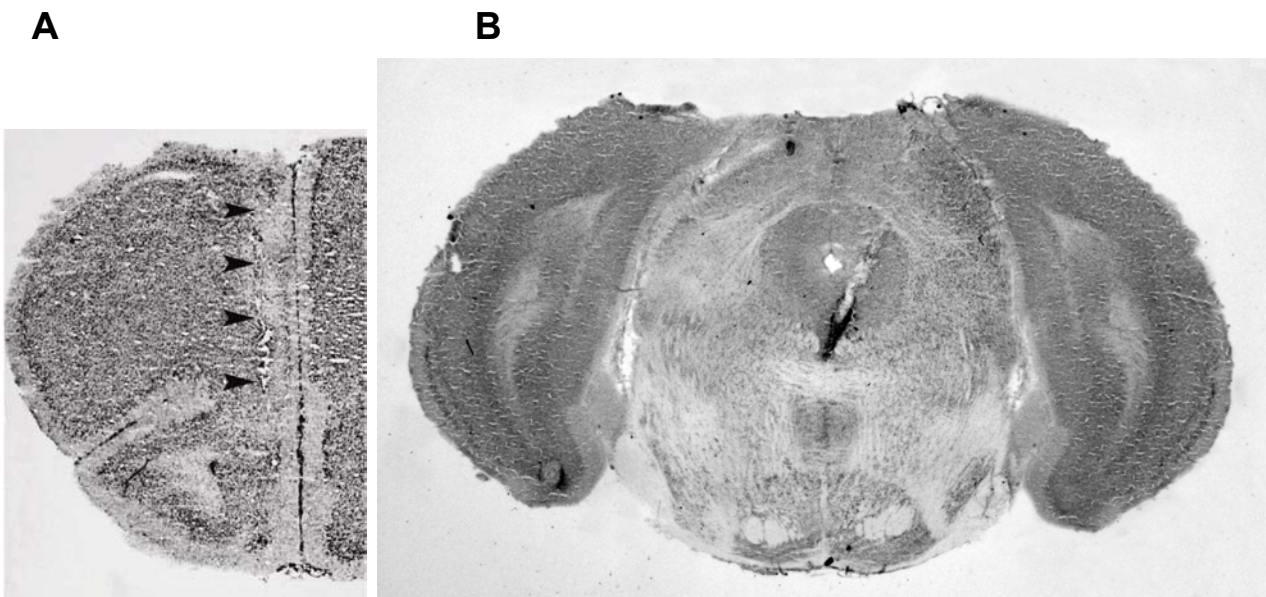


Figura 12. Localització de la sonda de microdiàlisi a l'EPFm **(A)** i al nucli dorsal del rafe **(B)** de ratolí. Tinció amb Neutral Red d'una secció coronal d'un cervell de ratolí; aproximadament a + 2.2 mm antero-posterior respecte bregma mostrant la marca deixada per la sonda (fletxes; **A**) i del mesencèfal mostrant la marca de la sonda de diàlisi implantada al nucli dorsal del rafe de ratolí **(B)**. Escala, 1 mm.

2.8. Anàlisi de les mostres de diàlisi

Les concentracions de 5-HT i del seu metabòlit 5-HIAA, en les mostres de dialitzat, s' han analitzat mitjançant un sistema de cromatografia líquida d' alta resolució (HPLC) segons el mètode prèviament descrit en Adell i Artigas (1998). La separació dels compostos s' ha realitzat en una columna Beckman (San Ramon, CA, EUA) d' octadecilsilica (ODS), de 3 μm de grandària de partícula, una longitud de 7.5 cm i un diàmetre de 0.46 cm i han estat detectats amperomètricament mitjançant un detector electroquímic Hewlett-Packard 1049 (Palo Alto, CA, EUA) amb un potencial d' oxidació de + 0.6 V. Com a fase mòbil s' ha utilitzat un eluent de la següent composició per 1 litre d' aigua milliQ: 0.15 M de fosfat monosòdic (NaH_2PO_4), 1.8 mM de la sal sòdica de l' àcid 1-octanosulfònic i 0.2 mM de Na_2 -EDTA, ajustant el pH a 2.8 amb àcid fosfòric i afegint 30% de metanol. En aquestes condicions i treballant a un flux de 0.8 ml/min, els temps de retenció del 5-HIAA i de la 5-HT es troben entre 3.5 i 5 minuts, essent el límit de detecció per a la 5-HT d' 1 fmol. La quantificació dels compostos es va dur a terme a través d' un mètode estàndard (Nelson Turbochrom Navigator, Perkin-Elmer, San Jose, CA, EUA).

Per a la determinació de la DA, s' ha utilitzat un mètode anteriorment descrit (Ferré *et al.*, 1994). L' eluent es compon de 0.15 M de fosfat monosòdic (NaH_2PO_4), 0.7 mM de la sal sòdica de l' àcid 1-octanosulfònic i 0.5 mM de Na_2 -EDTA, ajustant el pH a 2.8 amb àcid fosfòric i afegint 12% de metanol. El temps de retenció de la DA és de 5 minuts aproximadament.

A la figura 13 es mostren els cromatogrames de les mostres de dialitzat a l' EPFm.

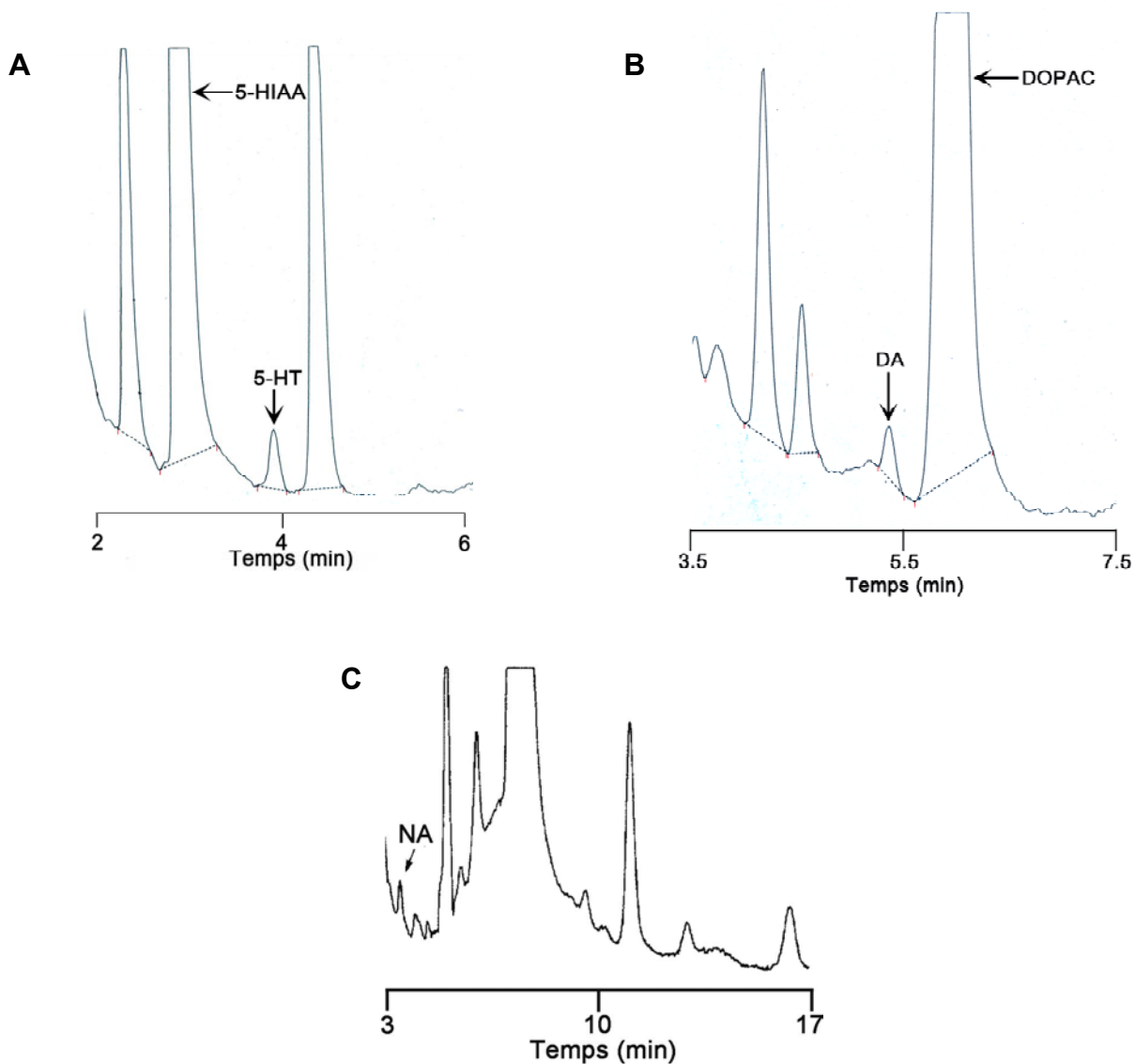


Figura 13. Cromatogrames d' una mostra de dialitzat a l' EPFm de rata mostrant la presència de 5-HT i 5-HIAA (A), de DA i DOPAC (B) i de NA (C). Les quantitats absolutes d' aquests compostos en una mostra de 30 μ l són de 49 fmols per la 5-HT, 6270 fmols pel 5-HIAA, 8 fmols per la DA, 300 fmols pel DOPAC i de 8 fmols per la NA.

Per a la determinació de la NA, s' ha utilitzat un mètode anteriorment descrit (Bortolozzi i Artigas, 2003). L' eluent es compon de 0.1 M de fosfat monopotàssic (KH_2PO_4), 2.3 mM de la sal sòdica de l' àcid 1-octanosulfònic i 0.1 mM de Na_2 -EDTA, ajustant el pH a 2.6 amb àcid fosfòric i afegint 15% de metanol. El temps de retenció de la NA és de 3.5 minuts a un flux de treball de 0.5 ml/min.

2.9. Anàlisi estadística de les dades

Les dades obtingudes s'expressen en fmols/fracció i es mostren en les figures com a percentatges dels valors basals (mitjanes individuals de les quatre fraccions pretractament). Aquests valors no han estat corregits pel factor de recuperació de la membrana de diàlisi. Les dades crues s'analitzen mitjançant l'anàlisi de la variància (ANOVA) de mesures repetides, seguit de tests *post-hoc* adequats per a comparar períodes pre- i post-tractament. En experiments més complexes l'anàlisi emprada és l'ANOVA de mesures repetides de dues vies, essent la concentració del fàrmac el factor independent, i el temps i el tractament les variables dependents.

