

Tesis Doctoral

Estudio de los mecanismos subyacentes a las alteraciones mediadas por cocaína y metilfenidato en el sistema tálamo-cortical de ratón. Rol de la serotonina en la modulación de la transmisión GABAérgica talámica

Goitia, Belén

2015-03-17

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Goitia, Belén. (2015-03-17). Estudio de los mecanismos subyacentes a las alteraciones mediadas por cocaína y metilfenidato en el sistema tálamo-cortical de ratón. Rol de la serotonina en la modulación de la transmisión GABAérgica talámica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Goitia, Belén. "Estudio de los mecanismos subyacentes a las alteraciones mediadas por cocaína y metilfenidato en el sistema tálamo-cortical de ratón. Rol de la serotonina en la modulación de la transmisión GABAérgica talámica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-17.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Estudio de los mecanismos subyacentes a las alteraciones mediadas por cocaína y metilfenidato en el sistema tálamo-cortical de ratón.

Rol de la serotonina en la modulación de la transmisión GABAérgica talámica.

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Belén Goitia

Director de tesis: Dr. Francisco José Urbano Suárez

Directora asistente: Dra. Verónica Bisagno

Consejera de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE), UBA-CONICET; Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, FCEyN, UBA; Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA), UBA-CONICET.

Buenos Aires, 2015

Fecha de defensa: 17 de marzo de 2015

Estudio de los mecanismos subyacentes a las alteraciones mediadas por cocaína y metilfenidato en el sistema tálamo-cortical de ratón. Rol de la serotonina en la modulación de la transmisión GABAérgica talámica.

Resumen.

Los efectos de la cocaína sobre la transmisión GABAérgica del sistema tálamo-cortical son similares a los previamente descritos para un conjunto de patologías psiquiátricas y neurológicas englobadas bajo el nombre de *síndrome de disritmia tálamo-cortical*, que presenta coherencia anormal entre bajas y altas frecuencias a nivel tálamo-cortical. Se cree que la presencia de bajas frecuencias en individuos despiertos puede subyacer un procesamiento sensorial anormal.

La cocaína ejerce sus propiedades en parte por el aumento en los niveles sinápticos de dopamina (DA) en los circuitos tálamo-corticales somatosensoriales, seguido por el aumento de norepinefrina (NE) y serotonina (5-HT), debido a la inhibición de los transportadores encargados de la recaptación de DA (DAT), NE (NET) y 5-HT (SERT). El metilfenidato (Ritalina ®, estimulante legal para tratar el Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad) bloquea DAT y NET, pero no afecta el SERT.

En este trabajo de tesis se plantea un estudio comparativo de ambos psicoestimulantes a fines de dilucidar los mecanismos responsables del fenómeno de disritmia tálamo-cortical asociado al consumo de cocaína. En primera instancia se vio que la administración de cocaína, ya sea aguda o sub-crónica, medió incrementos en la densidad de corriente a través de canales de calcio de tipo T en las neuronas del núcleo Ventrobasal del tálamo y aumentó la frecuencia de miniaturas de GABA desde las terminales del núcleo reticular talámico, lo que sugiere anormalidades en la transmisión GABAérgica talámica. En comparación, el metilfenidato mostró efectos mucho más sutiles, lo que lleva a asociar las diferencias con la modulación serotoninérgica de la sinapsis inhibitoria entre el núcleo reticular del tálamo y el núcleo Ventrobasal, mediada por cocaína pero no por metilfenidato.

A continuación, para poner a prueba dicha hipótesis, se realizaron experimentos de electrofisiología con rodajas obtenidas de animales *naïve* y se intentó emular los resultados de cocaína mediante la aplicación de 5-HT. Si bien este objetivo se logró, se encontró que los efectos de esta monoamina sobre la sinapsis GABAérgica en estudio siguen un curso temporal que indica que los receptores de 5-HT pueden sufrir un proceso de internalización.

En conjunto los resultados obtenidos podrían contribuir a explicar la dinámica aberrante en la actividad tálamocortical de ratones tratados con cocaína, similar al *síndrome de disritmia tálamocortical* descrito en humanos. Las diferencias entre la cocaína y el metilfenidato a nivel tálamocortical parecen sugerir la existencia de mecanismos de homeostasis sináptica por los cuales la neurotransmisión GABAérgica desde el núcleo reticular del tálamo y las conductancias de calcio de las neuronas postsinápticas del núcleo Ventrobasal responderían aumentando la liberación espontánea de GABA y la densidad de corriente de calcio tipo T postsináptica tras el aumento transitorio de la 5-HT mediado por cocaína.

Palabras clave: sistema tálamocortical; cocaína; GABA; metilfenidato; serotonina

Mechanisms underlying alterations mediated by cocaine and methylphenidate on the mouse thalamocortical system. Role of serotonin in the modulation of thalamic GABAergic transmission.

Abstract.

The effects of cocaine on thalamic GABAergic transmission resemble those described in several psychiatric and neurological pathologies included in the *thalamocortical dysrhythmia syndrome*, characterized by an anomalous coherence between high and low EEG frequencies. The presence of low frequencies in awake individuals is thought to cause aberrant processing of sensitive inputs.

The known effects of cocaine are mainly achieved through the increase in synaptic levels of dopamine (DA), norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT), caused by the inhibition of the uptake by their respective transporters (DAT, NET and SERT). Methylphenidate (Ritalin ®, a drug widely prescribed for the treatment of Attention Deficit and Hyperactivity Disorder) blocks DAT and NET, but not SERT.

These studies compare the two psychostimulants with a view to unraveling the mechanisms that underlie the thalamocortical dysrhythmia syndrome associated with cocaine use. Firstly, we found that cocaine administration, either acute or sub-chronic, led to an increase in the calcium current through T-type calcium channels in thalamic Ventrobasal neurons and to an increase in the frequency of GABAergic miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs), revealing an alteration in thalamic GABAergic transmission. Comparatively, the effects of methylphenidate are subtle, suggesting the existence of a cocaine-mediated serotonergic modulation of the inhibitory synapse between the thalamic reticular nucleus and the Ventrobasal nucleus.

To test this hypothesis we tried to reproduce the results obtained previously with cocaine-treated animals in brain slices from naïve mice through the incubation and puff-application of 5-HT. Our results show that even though 5-HT can mimic the effects of cocaine in the thalamus, it follows a time course consistent with an internalization process of 5-HT receptors.

Taken together, the results here presented might help explain the aberrant dynamics in the thalamocortical activity seen in mice treated with cocaine, similar to the *thalamocortical dysrhythmia syndrome* described in humans. The differences found between cocaine and methylphenidate suggest the existence of homeostatic mechanisms through which GABAergic transmission from the thalamic reticular nucleus and T-type calcium currents in postsynaptic Ventrobasal neurons are enhanced due to the transient increase in 5-HT levels induced by cocaine.

Key words: thalamocortical system; cocaine; GABA; methylphenidate; serotonin

Agradecimientos

Este trabajo de tesis ocupó gran parte de mi vida durante cinco años, y afortunadamente me llevó a conocer a muchísimas personas que de alguna u otra forma me ayudaron a realizarlo. A todas ellas quiero agradecerles profundamente.

En primer lugar, gracias a mis directores. A Francisco por adoptarme como su primera becaria y enseñarme la electrofisiología que no aparece en los libros, por su amabilidad y su comprensión. A Verónica por sus conocimientos y su detallismo.

Gracias también a mis compañeras de equipo. A Mariana por ser una enciclopedia farmacológica y neurológica viviente (su mate con hierbas serranas y edulcorante nunca me gustó, aunque debe ser bueno para la memoria), pero más que nada por su amistad. A Betina por ser una enfermita de la estadística bien hecha, por su criterio y sus consejos. A Celeste por su compañía durante el último tramo y por ocupar conmigo la oficina del jefe.

Gracias a la gente que me acompañó en el IFIBYNE: Mariano, Maru, Laura, Paula, Lucas, Joaquín, Carlota, Carina, Lucía, Ayelén, Lira, Hernán, Vero, Amaranta, Noe, Mauri, Nico, José y Ramona. Con ellos compartí mates, frustraciones, salidas, festejos de todo tipo, recetas y hasta plantines de huerta. Quiero destacar la labor de Maru, que me alivió el trabajo incontables veces, la bondad de Mariano y de Carlota, siempre dispuestos a ayudar con lo que sea, y la paciencia de Laura con la puesta a punto de los western blots.

Gracias a los chicos del ININFA, que me integraron sin dudarlo aunque sólo nos viéramos esporádicamente: Guto, Mimi, Martín Casanelli y Martín Codagnone, Roxana, Mer, Andrés y Vale.

Gracias a Edgar por abrirme las puertas de su laboratorio en dos oportunidades. I'd like to thank Susan for all she's done for me, for being a great roommate and a friend, and Neso for letting me use his rig and his bike, and for keeping me company.

Gracias a Mauro, Vero, Meli y Camilo, porque si bien nunca trabajé con ellos, son mis amigos de la facu, los amigos con los que puedo charlar de ciencia y de la experiencia de hacer el doctorado, porque estamos todos en la misma.

También quiero agradecer a todos los que me apoyaron por fuera del ámbito académico.

A mi mamá, porque siempre está ahí para escucharme y darme consejos, alegrarse conmigo, reconfortarme cuando estoy en problemas y ser la alegría de vivir encarnada. A mi papá, por ser mi primer maestro y fomentar en mí la búsqueda del conocimiento, el

pensamiento lógico y la practicidad para resolver problemas. A mis hermanos, Iña, Javi y Guille, por las peleas y las risas. A mis tías María Belén y Cecilia, por llenarse de orgullo con cualquier cosa que yo haga. A mis abuelos Sara, Lola y Carlos, por el amor entregado. A mi prima Mercedes por ser mi mejor amiga. A mi primo Joaquín por las charlas por Skype.

A todos los que supieron darme su amistad, en especial a Ceci y a Celes.

A mis profesores, compañeros y alumnos de acrobacia aérea, por permitirme volar y así mantener la cordura, por las muestras hermosas, entrenamientos y fernets armados con precisión milimétrica.

A Dami, por compartir conmigo su visión del mundo y andar a mi lado sobre caminos reales e imaginarios, por su ternura y sus payasadas. Me encanta nuestra vida, amor.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:

Goitia, B., Raineri, M., González, L. E., Rozas, J. L., Garcia-Rill, E., Bisagno, V., y Urbano, F. J. (2013). Differential effects of methylphenidate and cocaine on GABA transmission in sensory thalamic nuclei. *Journal of neurochemistry*, 2013, 124, (5):602-12.

Abreviaturas

5-HT:	serotonina (5-hidroxitriptamina)
aCSF:	líquido céfalo-raquídeo artificial
AD:	núcleo anterodorsal
ADHD:	Déficit de Atención con Hiperactividad (<i>Attention Deficit Hyperactivity Disorder</i>)
AI:	corteza auditiva primaria
AII:	corteza auditiva secundaria
AM:	núcleo anteromedial
AMPA:	ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc:	adenosín monofosfato-3',5' cíclico
ANOVA:	análisis de la varianza
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
ATP:	adenosina trifosfato
ATV:	área tegmental ventral
AV:	núcleo anteroventral
CC:	clorhidrato de cocaína
CCDV:	canales de calcio dependientes de voltaje
CeM:	núcleo Central medial
CL anterior:	núcleo lateral central anterior
CL posterior:	núcleo lateral central posterior
CL:	núcleo central lateral
CM:	núcleo centromediano
CNQX:	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
D:	aspartato
DA:	dopamina
DAT:	transportador de dopamina
DHP:	dihidropiridina
DL:	grupo latero dorsal
DL-AP5:	ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico
E:	ácido glutámico
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
EEG:	electroencefalograma
EGTA:	etilenglicol-bis (2 aminoetiléter) NN' tetracético
GABA:	ácido gamma-aminobutírico
GAD:	glutamato descarboxilasa
Glu:	glutamato
Gpi:	globus pallidus internus

GTP:	guanosina trifosfato
Hepes:	ácido 2-[4-(2-Hidroxietyl)-1-piperacínil]-etanosulfónico
HRP:	peroxidasa de rábano (<i>horseradish peroxidase</i>)
HVA:	alto umbral de activación (<i>high-voltage activated</i>)
IML:	lámina medular interna
IPSC:	corriente inhibitoria postsináptica
KO:	<i>knockout</i>
LD:	núcleo laterodorsal
LGd:	núcleo geniculado laterodorsal
LM:	lemnisco medial
LP:	grupo lateral posterior
LP-PI:	complejo o núcleo lateral posterior-pulvinar inferior
LVA:	bajo umbral de activación (<i>low-voltage activated</i>)
MAO:	monoamino oxidasa
MD:	núcleo mediodorsal
MDc:	segmento central del núcleo mediodorsal
MDm:	segmento medial del núcleo mediodorsal
MDMA:	metilendioximetanfetamina
MDpl (CL):	núcleo mediodorsal pars lateralis (núcleo central lateral)
MDr:	núcleo mediodorsal rostral
MGd anterior:	núcleo dorsal anterior del complejo geniculado medial.
MGd posterior:	núcleo dorsal posterior del complejo geniculado medial.
MGmc:	núcleo magnocelular del complejo geniculado medial
MGp:	núcleo parvocelular del complejo geniculado medial
MGv:	núcleo ventral del complejo geniculado medial
MI:	corteza motora primaria
MPH:	metilfenidato
MV (reuniens):	núcleo medioventral (reuniens)
NAC:	núcleo accumbens
NE:	norepinefrina
NET:	transportador de norepinefrina
NIDA:	<i>National Institute of Drug Abuse</i>
NIH:	<i>National Institute of Health</i>
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NP-40:	nonil fenoxipolietoxietanol
PARA:	núcleo paraventricular anterior
PARP:	núcleo paraventricular posterior
PC:	núcleo paracentral

PC12:	línea celular del feocromocitoma
Pf:	núcleo parafascicular
Pia:	núcleo pulvinar anterior
Pli:	núcleo pulvinar inferior
Pll:	núcleo pulvinar lateral
PIm:	núcleo pulvinar medial
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Po:	núcleo o complejo posterior del tálamo
Pol:	núcleo intermedio posterior
Pom:	núcleo posteromedial
PPR:	cociente de pulsos pareados (<i>paired-pulse ratio</i>)
Pt:	pretectum
PVT:	núcleo paraventricular
QX-314:	bromuro de <i>N</i> -(2,6-Dimetilfenilcarbamoilmetil) trietilamonio
REM:	movimiento ocular rápido (<i>rapid eye movement</i>)
RIPA:	ensayo de radioinmunoprecipitación
SAL:	sistema anterolateral
SDS:	dodecilsulfato de sodio
SERT:	transportador de serotonina
SG:	núcleo supragenicolado
SI:	corteza somatosensorial primaria
SII:	corteza somatosensorial secundaria
SNC:	sistema nervioso central
SNpc:	sustancia nigra pars compacta
SNpr:	sustancia nigra pars reticulata
T:	treonina
TBS:	buffer tris-salino
TBST:	buffer tris-salino-tween 20
TEA:	tetraetilamonio
TH:	tirosina hidroxilasa
ThCo:	tálamocortical
TTX:	tetrodotoxina
VA:	núcleo ventral anterior
VAmc:	núcleo ventral anterior magnocelular
VAp:	núcleo ventral anterior parvocelular
VB:	núcleo Ventrobasal
VI:	área visual primaria
VII:	área visual secundaria

VL:	complejo ventral lateral
VLa:	núcleo ventral lateral anterior
VLp:	núcleo ventral lateral posterior
VM:	núcleo ventral medial principal
VMAT:	transportador vesicular de monoaminas
VMb:	núcleo ventral medial basal
VMp:	núcleo ventral medial posterior
VMP:	núcleo ventroposteromedial
VP (VB):	complejo ventroposterior/Ventrobasal
VPI:	núcleo ventral posteroinferior
VPL:	núcleo ventroposterolateral
VPM:	núcleo ventroposteromedial
W:	triptofano
WT:	<i>wild-type</i>

Índice

Introducción	15
1. Sistemas tálamocorticales.....	16
1.1. Anatomía y conectividad	16
1.2. Circuito tálamocortical y modalidades de disparo de potenciales de acción..	20
1.3. Rol de la corriente h (I_H) en el circuito tálamocortical.....	23
1.4. Núcleo Ventrobasal	25
2. Canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV)	26
2.1. Generalidades de los CCDV.....	26
2.2. Canales de calcio de bajo umbral de activación.....	28
2.3. Canales de calcio de alto umbral de activación.....	29
3. Receptores de GABA	30
4. Psicoestimulantes	32
4.1. Adicción.....	32
4.2. Efectos de la cocaína y el metilfenidato sobre el sistema tálamocortical somatosensorial.....	36
5. Inervación monoaminérgica del sistema tálamocortical somatosensorial de ratón..	37
5.1. Dopamina.....	37
5.2. Serotonina	39
Objetivos	42
Metodología	44
1. Animales	45
2. Administración de psicoestimulantes <i>in vivo</i>	45
3. Obtención de rodajas.....	46
4. Dispositivos para los registros de <i>patch-clamp</i>	47
5. Técnica de <i>patch-clamp</i> . Configuración de célula entera	48
6. Aplicación localizada de serotonina	49
7. Registros de corrientes espontáneas miniatura.....	49
8. Registros de corrientes evocadas	51
8.1. Corrientes inhibitorias postsinápticas evocadas	51
8.2. Corrientes de calcio	53

9. Registros en fijación de corriente (<i>current-clamp</i>).....	53
10. Actividad locomotora	54
11. Experimentos bioquímicos.....	55
11.1. Obtención y cuantificación de proteínas totales del tálamo de ratón.....	55
11.2. Electroforesis en gel de una dimensión y <i>western blot</i>	56
12. Análisis estadístico	57
13. Drogas.....	57
Resultados y Discusión	58
1. Activación locomotora mediada por la administración <i>in vivo</i> de <i>binge</i> de cocaína y metilfenidato	59
1.1. Esquema de tratamientos	59
1.2. Registros conductuales.....	59
2. Registros electrofisiológicos de <i>patch-clamp</i>	62
2.1. Efectos de la administración <i>in vivo</i> de cocaína y metilfenidato sobre la transmisión GABAérgica talámica espontánea y sobre los canales de calcio en neuronas del núcleo Ventrobasal talámico.....	62
2.2. Efectos de la administración <i>in vivo</i> de cocaína y metilfenidato sobre la transmisión GABAérgica evocada sobre el núcleo Ventrobasal talámico	65
2.3. Efectos de la aplicación de cocaína y metilfenidato <i>in vitro</i> sobre el núcleo reticular talámico	70
3. Efectos de cocaína sobre la expresión de GAD y CCDV tipo T	73
3.1. GAD.....	73
3.2. Canales de calcio de tipo T.....	79
4. Rol de la serotonina en la modulación GABAérgica tálamocortical inducida por cocaína.....	84
4.1. Efectos de la aplicación <i>in vitro</i> de serotonina sobre la liberación GABAérgica espontánea sobre el núcleo Ventrobasal talámico: registros de <i>patch-clamp</i> en rodajas obtenidas de animales naïve.....	84
4.2. Efectos de la aplicación local (<i>puff</i>) de serotonina sobre la liberación GABAérgica espontánea y las corrientes de calcio del núcleo Ventrobasal	

talámico: registros de <i>patch-clamp</i> en rodajas obtenidas de animales knockout 5-HT _{2A}	89
4.2.1. Estudio de los mecanismos presinápticos.....	89
4.2.2. Estudio de los mecanismos postsinápticos.....	96
4.3. Efectos de la aplicación local (<i>puff</i>) de serotonina sobre la corriente h (I _H) y su rol en la neurotransmisión GABAérgica espontánea del núcleo Ventrobasal talámico: registros de <i>patch-clamp</i> en rodajas obtenidas de animales knockout 5-HT _{2A}	100
Discusión general	103
Conclusiones	106
Referencias	107

INTRODUCCIÓN

1. Sistemas tálamocorticales

1.1. Anatomía y conectividad

El tálamo está constituido por un conjunto de estructuras neuronales que se originan en el diencéfalo (división del prosencéfalo en el embrión), y es la estructura más voluminosa de esta zona. Se halla en el centro del cerebro, encima del hipotálamo y separado de éste por el surco hipotalámico de Monro. Tradicionalmente se divide en epitálamo, tálamo dorsal y tálamo ventral (Jones, 2007). El epitálamo está conformado por los núcleos paraventricular y habenuar, y no se conecta con la corteza cerebral. El tálamo dorsal (Hirai y Jones, 1989) consta de un gran número de núcleos de relevo (Figura 1; Tabla 1) que participan en una amplia gama de funciones correspondientes a los sistemas motor, sensitivo y límbico. El tálamo ventral (que como regla general recibe fibras de la corteza y los ganglios de la base pero no envía axones a estas estructuras) está compuesto principalmente por neuronas GABAérgicas agrupadas en el núcleo reticular, el núcleo geniculado ventrolateral, la *zona incerta* y los campos de Forel. Tanto en roedores como en lagomorfos, murciélagos y marsupiales, no se encuentran interneuronas GABAérgicas en los núcleos talámicos dorsales, con la excepción del núcleo geniculado dorsal (Arcelli y cols., 1996), lo que implica que la inhibición sobre los núcleos del tálamo dorsal está mediada exclusivamente por aferentes GABAérgicos desde el núcleo reticular.

Tabla 1: Aferencias subcorticales y blancos corticales de los núcleos talámicos. En negrita se resalta el núcleo ventrobasal. (Modificado de Jones, 2007).

No primate	Primate	Aferencias Subcorticales	Principales blancos corticales
<i>Grupo Ventral</i>			
VA	VAp	Sustancia Negra	Prefrontal difusa y cingulada difusa
	VAmc	Sustancia Negra	Prefrontal difusa y cingulada difusa (+ estriado)
VL	VLa	Globo pálido medial	Principalmente premotor
	VLp	Núcleos cerebelosos profundos	Principalmente motor
		Núcleos vestibulares	
		Tracto espinotalámico (un	

		segmento)	
VM	VMp	Sustancia Negra	Prefrontal y cingulada difusas
	VMb	Gusto, Vagal, espinal	SI y G, peri insular
	Submedial	Espinal (?) y otros	Fronto medial
VP (VB)	VPL, VPM	Vía trigémino-talámica, tracto espinotalámico	Cortezas somatosensoriales SI (áreas 3a,3b, 1, 2) y SII
	VPI	Espinal y otros	

Grupo Lateral

LP-PI	LP	Colículo superior y pretectum	Área 5 (posterior)
	Pia	Espinal, trigeminal	Área 5 (anterior)
	PII	Colículo superior y pretectum	Parietotemporal y hacia occipital difuso
	PIm	Colículo superior y pretectum	Circunvolución temporal superior
	Pli	Colículo superior (capas superficiales) y pretectum, retina	Preestriado

Grupo
Posterior

Po	SG-limitans	Colículo superior (capas profundas)	Ínsula granular (+ estriado)
	Pom	Espinotalámico	Retroinsular (mono), barriles corticales (rata), área 5 (gato)
	Pol	Auditivo	Posauditiva (mono), campo auditivo anterior (gato)

Complejo
Geniculado
Medial

MGp	MGv	Núcleo central, colículo inferior	AI
	MGd anterior	Núcleo externo o pericentral del colículo	All y otros campos alrededor de AI

		inferior	
	MGd posterior		Campo auditivo temporal
MGmc	MGmc	Múltiple	Difusamente en corteza Insular-temporal/parietal
<hr/>			
<i>Núcleo geniculado latero dorsal</i>			
LGd	Capas parvocelulares	Retina X (gato) o P (mono)	Corteza estriada, capa IVA y IVC β , I
	Magnocelular	Retina Y (gato) o M (mono)	Corteza estriada, capa IVC α
C laminae (gato)		Retina W, y capas superficiales del colículo superior	Difuso, principalmente capas I y III
	Lámina S e intercalada	Colículo superior, retina (azul "on" y otros)	Corteza estriada y áreas preestriadas, capas superficiales
<hr/>			
<i>Grupo medial</i>			
MD	MDpl (CL)	Espinal, colículo superior	Campo ocular frontal
	MDC, MDm, MDr	Corteza olfatoria y amígdala	Orbitofrontal Latero Frontal Estructuras olfatorias basales
	MV (reuniens)	Amígdala, cerebro-anterior basal	Formación hipocampal y regiones adyacentes
Pt	Pt	Hipotálamo y otras regiones del cerebro-anterior basal	Medio frontal/entorrinal/paraolfatorio (+estriado)
<hr/>			
<i>Complejo Anterior</i>			
AV	AV	Núcleo mamilar	Límbica anterior
AM	AM	Núcleo mamilar	Cingulada, subículo, retroesplénica y presubículo
AD	AD	Núcleo mamilar	
LD	LD	Pretectum, hipotálamo	Cingulada, retroesplénica
<hr/>			
<i>Complejo Intralaminar</i>			

CL posterior	CL posterior	Espinotalámico	Estriado y difusos al área 4, SI, parietal
CL anterior	CL anterior	Núcleo cerebeloso, formación reticular, sustancia negra y colículo superior	Parietal, frontal
CM	CM	Gpi	Frontal, motor incluido
Pf	Pf	Sust. Gris Periacueductal/Tronco	Lateral, frontal

Abreviaturas: **VA**, ventral anterior; **VAp**, ventral anterior parvocelular; **VAmc**, ventral anterior magnocelular; **VL**, complejo ventral lateral; **VLa**, núcleo ventral lateral anterior; **VLp**, núcleo ventral lateral posterior; **VM**, ventral medial principal; **VMp**, ventral medial posterior; **VMB**, ventral medial basal; **SI**, corteza somatosensorial primaria; **VP (VB)**, complejo ventroposterior/Ventrobasal; **VPL**, ventro portero lateral; **VPM**, ventroposteromedial; **SII**, corteza somatosensorial secundaria; **VPI**, ventral posteroinferior; **LP-PI**, complejo o núcleo lateral posterior-pulvinar inferior; **LP**, grupo lateral posterior; **Pia**, pulvinar anterior; **PII**, pulvinar lateral; **PIm**, pulvinar medial; **PIi**, pulvinar inferior; **Po**, núcleo o complejo posterior del tálamo; **SG**, supragenículado; **Pom**, posteromedial; **Pol**, intermedio posterior; **MGp**, parvocelular del complejo geniculado medial; **MGv**, ventral del complejo geniculado medial; **AI**, corteza auditiva primaria; **MGd anterior**, dorsal anterior del complejo geniculado medial; **AII**, corteza auditiva secundaria; **MGd posterior**, dorsal posterior del complejo geniculado medial; **MGmc**, magnocelular del complejo geniculado medial; **LGd**, geniculado laterodorsal; **MD**, mediodorsal; **MDpl (CL)**, mediodorsal pars lateralis (central lateral); **MDC**, segmento central del núcleo mediodorsal; **MDm**, segmento medial del núcleo mediodorsal; **MDr**, mediodorsal rostral; **MV** (reuniens), medioventral (reuniens); **Pt**, pretectum; **AV**, anteroventral; **AM**, anteromedial; **AD**, anterodorsal; **LD**, laterodorsal; **CL posterior**, lateral central posterior; **CL anterior**, lateral central anterior; **CM**, centromediano; **Gpi**, glubus pallidus internus; **Pf**, parafascicular.

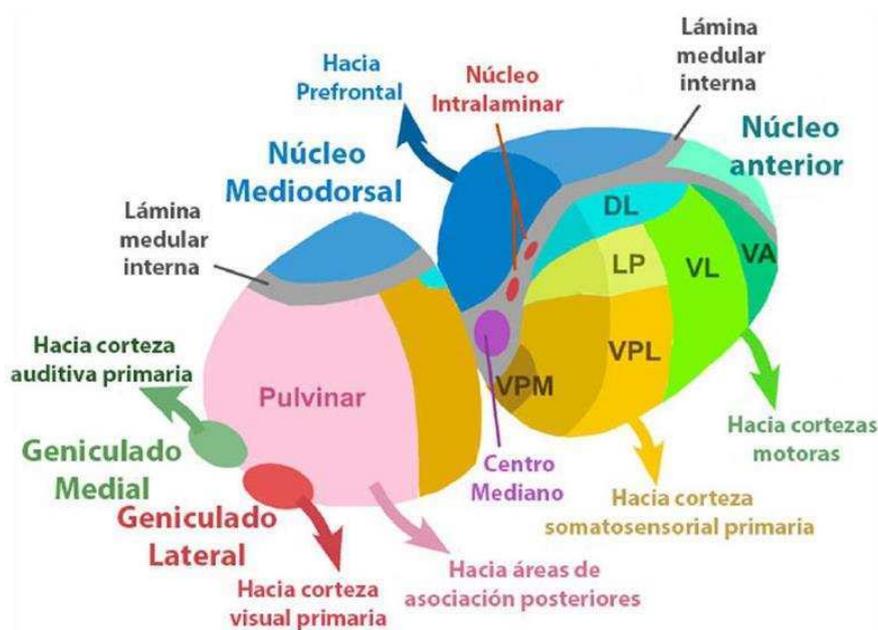


Figura 1. Principales núcleos del tálamo dorsal y proyecciones corticales.

VA: grupo ventral anterior; VL: grupo ventral lateral; DL: grupo latero dorsal; LP: grupo lateral posterior; VPL: núcleo ventroposterolateral; VPM: núcleo ventroposteromedial. Modificado de The Brain Thalamus, Rudyard 2012

1.2. Circuito tálamocortical y modalidades de disparo de potenciales de acción.

Las neuronas talámicas de proyección se conectan específicamente con la corteza cerebral en forma de “lazos” (*loops* en inglés) de conexiones sinápticas tálamocorticales (ThCo). A su vez casi todas las regiones de la corteza cerebral establecen proyecciones recíprocas que regresan a los núcleos talámicos de los que recibieron originalmente la información sináptica. Distintos núcleos talámicos reciben información somatosensorial, visual o auditiva y transmiten esta información a la corteza cerebral. Otros núcleos talámicos reciben impulsos de áreas motoras subcorticales y proyectan a aquellas zonas de la corteza que controlan la ejecución motora. Cabe destacar que los núcleos talámicos intralaminares (CL, Pf, etc.) reciben y procesan información propioceptiva procedente de núcleos motores y del tronco del encéfalo, y proyectan de forma difusa a capas superiores e inferiores de la neocorteza (Van der Werf y cols., 2002). Usando colorantes sensibles a voltaje en rodajas tálamocorticales, se ha mostrado que la estimulación simultánea de los núcleos talámicos de proyección

somatosensorial e intralaminar centrolateral produce una activación máxima de la corteza somatosensorial (Llinás y cols., 2002).

Las neuronas piramidales corticales (desde la corteza somatosensorial, visual, etc.) proyectan a las neuronas talámicas de relevo a través de fibras cortico-talámicas que a su vez presentan colaterales que excitan el núcleo reticular, lo que genera una inhibición de tipo *feed-forward* sobre las neuronas de relevo (Figura 2). Esta conectividad es de especial importancia para la actividad coherente del sistema ThCo.

Las neuronas de relevo poseen propiedades intrínsecas de la membrana que les confieren dos modalidades de disparo, tónico o por ráfagas (*bursts*). El potencial de reposo de las neuronas tálamo-corticales se encuentra en torno a -60mV . Si la membrana se encuentra a potenciales más hiperpolarizantes (esto es, más negativos respecto del

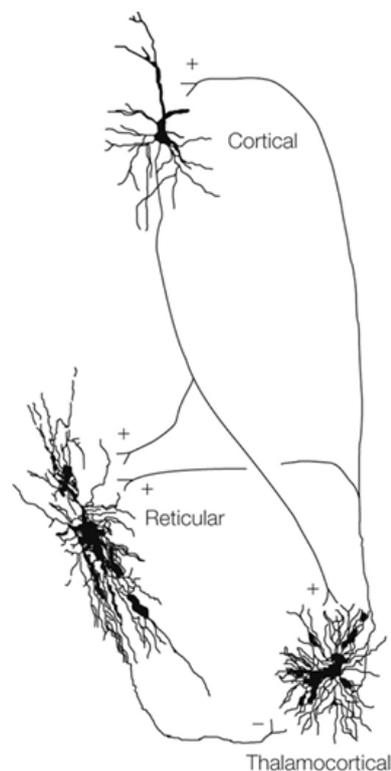


Figura 2. Circuito sináptico básico del sistema tálamo-cortical. Se muestra una neurona de la corteza, una del núcleo reticular del tálamo y una neurona talámica de relevo (*thalamocortical*). Las sinapsis excitatorias, glutamatérgicas, se indican con el signo +, y la sinapsis inhibitoria, GABAérgica, con el signo -. Modificado de Steriade, 2005.

potencial de reposo), un estímulo despolarizante permite que las neuronas tálamocorticales respondan con una despolarización lenta sobre la que se monta una ráfaga (*burst*) de dos a ocho potenciales de acción de Na^+/K^+ a una frecuencia *intra**burst* de 100-450 Hz. La despolarización lenta está mediada por una corriente subyacente de Ca^{2+} a través de canales de tipo T, de bajo umbral de activación. Esta corriente se inactiva a potenciales más despolarizantes que el potencial de reposo, pero se activa (tras ser desinactivada por hiperpolarización) en el rango de potenciales de membrana más hiperpolarizados, de -65mV a -90mV (Coulter y cols., 1989; Huguenard y McCormick, 1992). La desinactivación de la corriente T tiene una cinética lenta, por lo que para generar un segundo potencial de bajo umbral la célula debe permanecer a un potencial de membrana hiperpolarizado ($<-65\text{mV}$) por un periodo de tiempo del orden de las decenas de milisegundos (Huguenard y McCormick, 1992). La inhibición por parte de las neuronas del núcleo Reticular sobre las neuronas de relevo está mediada por potenciales inhibitorios (hiperpolarizantes) de larga duración, lo que permite el “anclado” de las neuronas de relevo en modo de *bursts* repetitivos.

Los dos tipos de disparo, tónico o por ráfagas (*bursts*), se observan en diferentes estadios del ciclo sueño-vigilia: la actividad de *bursts* se correlaciona con las ondas lentas de gran amplitud que se observan en el EEG durante el sueño de ondas lentas, mientras que el disparo tónico correlaciona con las ondas de baja amplitud y alta frecuencia que se observan en el EEG durante la vigilia y el sueño REM (revisado en Steriade y Llinás, 1988; Steriade y Timofeev, 2003). Este comportamiento neuronal también se ha observado en el tálamo humano sin encontrarse bajo los efectos de anestesia (Kiss y cols., 1995; Tsoukatos y cols., 1997). El potencial de membrana de reposo, que determina el modo de disparo, está regulado por las aferencias que el tálamo recibe del núcleo colinérgico pedunculopontino del tallo encefálico, también capaz de generar oscilaciones de banda γ (gamma) (Urbano y cols., 2012; Garcia-Rill y cols., 2013).

La cinética de inactivación de la corriente por canales tipo T evita que las neuronas de relevo disparen *bursts* en forma repetida a alta frecuencia. El límite superior para los *bursts* es de aproximadamente 12Hz, y aumentar la frecuencia de la estimulación lleva a una reducción de la amplitud de los potenciales de bajo umbral porque cada pulso despolarizante puede actuar sobre una población de canales T no inactivados cada vez

más pequeña (McCormick y Feuser, 1990). El tope de 12Hz impone una restricción de frecuencia a las oscilaciones tálamocorticales que se generan al comenzar el sueño de ondas lentas, y se cree que, al no poder generarse *bursts* a frecuencias mayores, las neuronas talámicas en este estado no pueden transmitir con fidelidad los *inputs* provenientes de la periferia (McCormick y Bal, 1997; Steriade, 2001). En el modo de disparo tónico, por el contrario, las neuronas de relevo pueden disparar potenciales de acción a más de 100Hz, lo que permite una transmisión prácticamente lineal de la información periférica hacia la corteza.

Los canales tipo T se encuentran por lo general en los somas neuronales o en las dendritas proximales (Destexhe y cols., 1998; Williams y Stuart, 2000), mientras que los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) tipo P/Q suelen ubicarse en las dendritas distales, donde permiten la despolarización de la membrana y la consiguiente activación de corrientes de K^+ dependientes de la entrada de Ca^{2+} , lo que confiere la capacidad de despolarizar la membrana de forma repetida ante la estimulación corticotalámica (Pedroarena y Llinás, 1997).

1.3. Rol de la corriente h (I_H) en el circuito tálamocortical

Cuando las neuronas de relevo se encuentran en el modo de disparo en *bursts*, entre un potencial de bajo umbral y el siguiente se observa una despolarización lenta debida a la activación de la corriente I_H , una conductancia catiónica (Na^+ y K^+) despolarizante que se activa por hiperpolarización de la membrana y que se inactiva con una cinética lenta (McCormick y Pape, 1990a). Esta corriente está mediada por los HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated*), canales dependientes de AMPc de los que se han descrito cuatro subunidades (HCN1-4; revisado por Frère y cols., 2004). La despolarización lenta provocada por esta corriente permite la activación de los canales tipo T que se han recuperado de su estado inactivo durante la hiperpolarización previa, lo que incrementa la despolarización. Esto lleva a que la corriente I_H se inactive y se genere el potencial de bajo umbral sobre el que se “montan” los potenciales de acción de Na^+/K^+ . Cuando la membrana se repolariza, la I_H se desactiva y permite su apertura nuevamente mientras que los canales tipo T se desinactivan, de manera que puede comenzarse un nuevo ciclo (Figura 3).

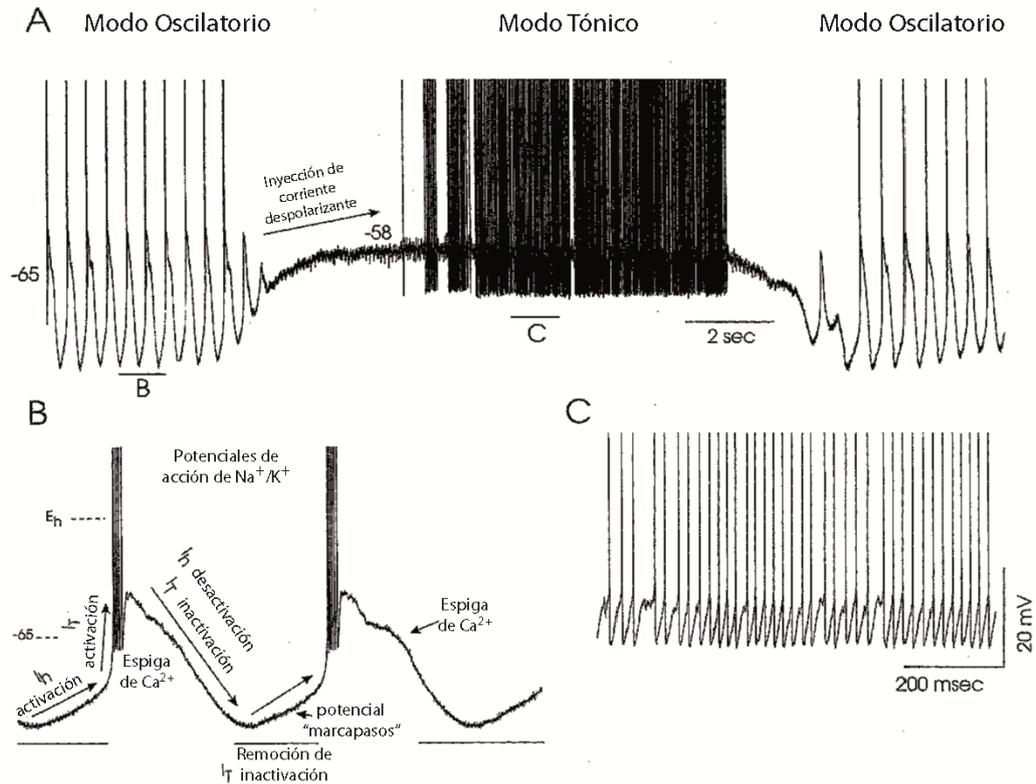


Figura 3. Modos de disparo de las neuronas del núcleo geniculado lateral de gato.

(A) A un potencial de membrana de -65mV , la neurona genera *bursts* de potenciales de manera espontánea, a 2Hz. Si se la despolariza a -58mV por inyección de corriente, el modo de disparo pasa a ser tónico. Al retirar la despolarización se recupera el disparo en *bursts*. (B) Detalle de la actividad oscilatoria en la región indicada en (A), en la que se muestra la participación de las corrientes I_H e I_T a lo largo del ciclo de disparo de potenciales de bajo umbral. (C) Detalle del modo de disparo tónico observado en (A). (Modificado de McCormick y Pape, 1990b).

La amplitud de la corriente I_H puede aumentarse en presencia de AMPc (e indirectamente con norepinefrina, histamina y serotonina) debido a que se produce un corrimiento de la dependencia de voltaje de esta corriente (Lüthi y McCormick, 1999; Frère y Lüthi, 2004; Frère y cols., 2004), lo que lleva a fallas en el mantenimiento del modo de disparo oscilatorio (Yue y Huguenard, 2001).

Las neuronas del núcleo reticular del tálamo también poseen propiedades intrínsecas que les permiten disparar en modo oscilatorio durante el sueño de ondas

lentas (Steriade y Wyzinski, 1972) y en modo tónico durante la vigilia y el sueño REM (Steriade y cols., 1986). Estas neuronas poseen canales de calcio tipo T (Huguenard y Prince, 1992) y modifican su modo de disparo según el potencial de membrana, pero el umbral entre las dos modalidades de disparo (aproximadamente -60mV) se encuentra más cercano al potencial de reposo (Bal y McCormick, 1993) y la curva de activación de la corriente I_T se encuentra despolarizada en comparación con la de las neuronas de relevo (Huguenard y Prince, 1992), por lo que las células del núcleo reticular siempre se encuentran al límite entre los dos tipos de disparo. Además, la cinética de activación de la I_T en estas neuronas es más lenta, y la tasa de inactivación depende del voltaje (Huguenard y Prince, 1992), por lo que sus potenciales de bajo umbral son más largos, así como los *bursts* de potenciales de Na^+/K^+ que se montan sobre ellos (Shosaku y cols., 1989). En cuanto al modo de disparo tónico, las neuronas del núcleo reticular son prácticamente indistinguibles de las de relevo (Steriade y cols., 1986).

1.4. Núcleo Ventrobasal

El Núcleo Ventrobasal (VB), determinado por la confluencia del núcleo ventroposterolateral (VPL) y el ventroposteromedial (VPM), limita lateralmente con la cápsula interna y ventralmente con la lámina medular externa. En el ser humano estos núcleos también se denominan ventral caudal externo y ventral caudal interno, respectivamente. El VPL está separado del VPM por las fibras de la lámina arcuata. El complejo ventral posterior recibe su irrigación por las ramas tálamo-geniculadas de la arteria cerebral posterior, y la afectación de estos vasos puede producir pérdida de la sensibilidad táctil de todo el cuerpo y la cabeza en el lado contralateral.

El VPL recibe estímulos ascendentes desde el lemnisco medial y el sistema anterolateral (SAL); las fibras de esta última vía terminan en las agrupaciones celulares situadas en la periferia del núcleo VPL. Los impulsos del VPM proceden de los fascículos trigeminotalámicos y tanto el SAL como el sistema trigémino-talámico terminan de manera somatotópica. En el VPL, las fibras del lemnisco medial que vienen del núcleo cuneiforme contralateral se colocan mediales a las del núcleo grácil. Como consecuencia, la representación del miembro inferior y del pie queda lateral en este

nivel, mientras que la del miembro superior queda medial. La representación de cada parte del cuerpo se distribuye por una lámina en forma de “C”.

Las neuronas que integran el complejo ventral son células multipolares de gran diámetro, cuyos axones atraviesan el brazo posterior de la cápsula interna y terminan principalmente en las cortezas somatosensoriales primaria (SI) y secundaria (SII). Estas células y fibras tálamo-corticales son las neuronas de tercer orden dentro del sistema de la columna dorsal-lemnisco medial, que envían impulsos excitatorios (glutamatérgicos) a la corteza. Además, estas células tálamo-corticales también están influidas por los impulsos GABAérgicos procedentes del núcleo reticular del tálamo (única fuente de inhibición GABAérgica en roedores; De Biasi y cols., 1997) y por las fibras excitatorias corticotalámicas (glutamatérgicas) que nacen en la capa VI de las cortezas SI y SII.

2. Canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV)

2.1. Generalidades de los CCDV

Se han descrito varios subtipos de CCDV denominados T, N, L, Q, P y R, clasificados por sus características electrofisiológicas y farmacológicas (Catterall, 2000). Una primera clasificación se basó en el umbral de activación, que puede ser alto (*high voltage activated*, HVA) o bajo (*low voltage activated*, LVA). Los subtipos N, L, R, Q y P pertenecen al primer grupo y son proteínas heteromultiméricas conformadas por las subunidades α_1 , $\alpha_2\delta$, β y γ . El segundo grupo está integrado sólo por los canales de tipo T, formados únicamente por la subunidad α_1 , que contiene cuatro dominios homólogos (I-IV) conectados mediante regiones citoplasmáticas. Cada uno de los cuatro dominios consta de seis hélices transmembrana (denominadas S1-S6), más una región “loop” que forma el poro. La subunidad α_1 determina la propiedad funcional más importante del canal, sensor el voltaje, y define el subtipo de canal (Catterall, 2000), mientras que las otras subunidades modulan sus propiedades (Walker y De Waard, 1998).

Actualmente, los CCDV han sido clasificados de acuerdo a las homologías genéticas de su subunidad α_1 : Ca_v 1.1 a 1.4 (tipo L), Ca_v 2.1 (tipo P/Q), 2.2 (tipo N) y 2.3 (tipo R) y

Ca_v 3.1 a 3.3 (tipo T). En la figura 4 se muestra cómo están relacionados los distintos canales de acuerdo a las similitudes entre sus secuencias aminoacídicas.

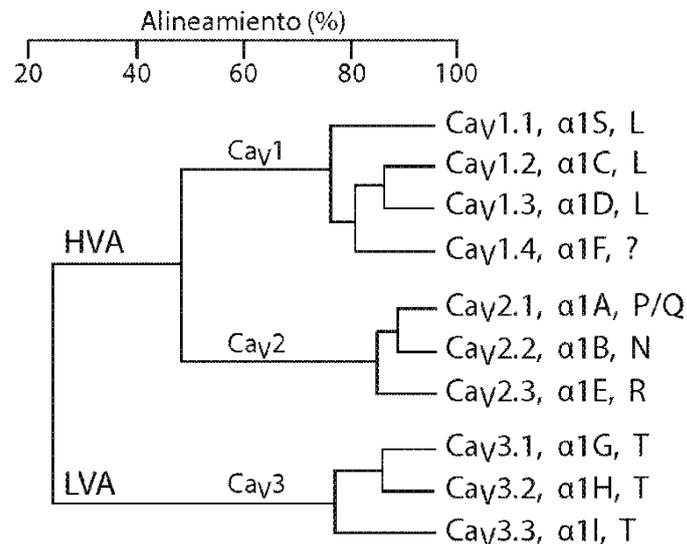


Figura 4. Árbol evolutivo de los CCDV. El árbol se basa en el alineamiento de secuencias de canales de calcio humanos en las regiones transmembrana y los dominios que forman el poro. (Adaptado de Perez-Reyes y cols., 1998).

Los CCDV pueden disecarse farmacológicamente, ya que son sensibles a diferentes toxinas y bloqueantes: los canales tipo P/Q (Ca_v 2.1) pueden bloquearse con ω -agatoxina IVA, aislada del veneno de la araña *Agelenopsis aperta* (Mintz, 1994); los canales de tipo N (Ca_v 2.2) se bloquean con la ω -conotoxina-GVIA, aislada del veneno del caracol marino *Conus geographicus* (Kerr y Yoshikami, 1984; Kasai y cols., 1987); la SNX-482 bloquea selectivamente el canal tipo R (Ca_v 2.3) y fue aislada del veneno de la tarántula africana *Hysteroocrates gigas* (Newcomb y cols., 1998); las dihidropiridinas (DHPs) son consideradas específicas para los canales de tipo L (Ca_v 1.1-1.4), aunque los de tipo T (Ca_v 3.1-3.3) pueden mostrar sensibilidad a ellas (Akaike y cols., 1989). Entre los compuestos inorgánicos utilizados para bloquear los CCDV se encuentran iones divalentes como el níquel, que bloquea indistintamente los canales tipo R y T, y el cobalto y el cadmio, que no presentan selectividad. Asimismo, se conocen bloqueantes más específicos de los canales T como octanol, mibefradil (menos usado por su perfil de bloqueo cruzado hacia canales de alto umbral de tipo N; ver Perez-Reyes, 2003) y NNC

55-0396 (compuesto derivado del mibefradil, con mayor eficiencia de bloqueo de canales tipo T; Huang y cols., 2004). Es importante destacar que recientemente se han descrito un grupo de compuestos de tipo piridil amina, TTA-A2 con una gran especificidad para el bloqueo de todos los subtipos de canales de tipo T (~300 veces más selectivos para el bloqueo de canales de tipo T que cualquier otro tipo de canales de calcio de alto umbral; Kraus y cols., 2010); así como los compuestos Z941 y Z944, capaces de prevenir los eventos de crisis de ausencia en modelos animales mediante el bloqueo específico de los canales de tipo T (Tringham y cols., 2012).

2.2. Canales de calcio de bajo umbral de activación

Como ya se mencionó antes, el umbral de activación de los CCDV tipo T es bajo, con lo que comienzan a abrirse con pequeñas despolarizaciones de la membrana celular. A esto podemos sumar las siguientes propiedades (Perez-Reyes, 2003): 1) durante un pulso constante la corriente a través de estos canales es transitoria, característica a la que deben su nombre; 2) al repolarizar la membrana, se cierran con una cinética lenta, por lo que se observa una corriente de cola; la conductancia de canal único es baja, y permiten el paso tanto de Ca^{2+} como de Ba^{2+} ; 3) se inactivan en un rango de voltaje que se solapa con el de activación, lo que determina una corriente de ventana (*window-current*), caracterizada por un rango de voltaje discreto en el que los canales T pueden abrirse sin inactivarse; la inactivación de los subtipos $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.2$ es rápida, mientras que la de los $\text{Ca}_v3.3$ es lenta.

Los canales tipo T, a diferencia de los HVA, no presentan una pérdida de funcionalidad (*rundown*) de las corrientes durante registros en la configuración de célula entera (*whole-cell*), que se sabe reduce los niveles de AMPc, ATP y Mg^{2+} y otros metabolitos intracelulares, indicando que no son fosforilados por kinasas dependientes de AMPc (Fedulova y cols., 1985), aunque sí son regulados por receptores acoplados a proteína G, por lo que se espera que sean sensibles a la ausencia de GTP y a la presencia de activadores o inhibidores de proteína G (Perez-Reyes y cols., 1998).

Los CCDV tipo T están evolutivamente relacionados con las subunidades α de los canales de K^+ , Na^+ y los HVA (Jan y Jan, 1990), por lo que es de esperarse que no presenten grandes diferencias con el canal de K^+ KcsA , cuya estructura ya ha sido

estudiada por cristalografía de rayos X (Doyle y cols., 1998). El canal tiene dos segmentos transmembrana separados por un dominio del poro (en CCDVs este dominio contiene la secuencia T-x-E/D-x-W), que le confiere la selectividad iónica. El segundo segmento transmembrana forma la pared del poro. Además hay otros cuatro segmentos transmembrana, de los cuales uno presenta cargas positivas en un tercio de los residuos y actúa como sensor de voltaje (Perez-Reyes, 2003).

La distribución de los ARNm de los canales tipo T no ha sido estudiada con detalle en ratón, pero sí en rata (Talley y cols., 1999). El ARNm del Cav3.1 se encontró en neuronas de relevo talámicas (incluyendo las neuronas del núcleo Ventrobasal del tálamo), bulbo olfatorio, amígdala, corteza, hipocampo, hipotálamo, cerebelo y tallo encefálico, y esto se corresponde con el perfil de expresión de la proteína (Craig y cols., 1999). El ARNm del Cav3.2 se halló en bulbo olfatorio, estriado, corteza, hipocampo y núcleo Reticular del tálamo, mientras que el del Cav3.3 se detectó en bulbo olfatorio, estriado, corteza, hipocampo, núcleo Reticular del tálamo, habénula lateral y cerebelo.

Si bien los canales T no poseen la secuencia *synprint* necesaria para acoplarse a la maquinaria de liberación de vesículas (Catterall, 1998; Perez-Reyes, 2003), se ha descrito que pueden mediar la transmisión sináptica en células cromafines de rata sometidas a hipoxia (Carabelli y cols., 2007a; Carabelli y cols., 2007b) y en células de la línea celular PC12 (*pheochromocytoma cell line*; Harkins y cols., 2003).

Como se detalla en la sección siguiente, el funcionamiento normal de los canales de calcio de HVA y de tipo T es crucial en la actividad ThCo, y su funcionamiento anormal puede derivar en el fenómeno de *disritmia ThCo*.

2.3. Canales de calcio de alto umbral de activación

Dentro del grupo de los canales de calcio de alto umbral de activación (HVA), los del tipo P/Q juegan un rol indispensable en la transmisión sináptica dado que la liberación vesicular de neurotransmisor depende principalmente de ellos (Llinás y cols., 1989; Uchitel y cols., 1992). En su composición los canales tipo P/Q contienen las subunidades α_1 , $\alpha_2\delta$, y β (Liu y cols., 1996; Martin-Moutot y cols., 1995, 1996).

Con respecto al sistema ThCo, los canales de tipo P/Q ubicados en las dendritas son responsables de las oscilaciones de banda γ (gamma), en el rango de 35-45Hz, que son fundamentales para el funcionamiento cognitivo normal y se observan tanto a nivel del circuito ThCo (Llinás y cols., 1998; Singer, 1998) como a nivel de neurona única, donde se aprecian como oscilaciones subumbral (Pedroarena y Llinás, 1997; Luo y Perkel, 1999; Rhodes y Llinás, 2005). Estos canales también median la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica en la corteza y el tálamo (Ali y Nelson, 2006; Iwasaki y cols., 2000), por lo que mutaciones en los canales P/Q afectan estos dos tipos de neurotransmisión (Caddick y cols., 1999; Pietrobon, 2005; Sasaki y cols., 2006).

Las transiciones entre las oscilaciones de banda γ y los *bursts* (ráfagas) de baja frecuencia (dependientes de canales tipo T) son rápidas y precisan de la activación diferenciada de los canales P/Q y T, por lo que cualquier alteración en la dinámica de activación de estos canales puede producir interacciones ThCo aberrantes, fenómeno que se denomina *síndrome de disritmia ThCo* (Llinás y cols., 1999; Llinás y cols., 2005). El primer modelo animal que reprodujo las alteraciones del *síndrome de disritmia ThCo* fue un ratón *knockout* (KO) para los canales P/Q (Jun y cols., 1999). Dicho KO presentó déficits motores y desarrollo de crisis de ausencia (un tipo de evento epiléptico). Estos ratones KO no sobreviven más de 21 días postnatales y presentan alteraciones en la neurotransmisión sináptica debidas a cambios en las corrientes de calcio presinápticas (Cao y cols., 2004; Song y cols., 2004; Urbano y cols., 2003), a pesar de que otros subtipos de canales de calcio toman el rol de los P/Q (Jun y cols., 1999; Urbano y cols., 2003; Inchauspe y cols., 2004; Pagani y cols., 2004). También se observa una mayor expresión de los canales tipo T, lo que explica el desarrollo de las crisis de ausencia (Song y cols., 2004).

3. Receptores de GABA

Los receptores GABA-A son proteínas hetero-oligoméricas que forman un canal de cloruro (Cl⁻). Las subunidades que pueden conformar el receptor provienen de 15 genes en humanos, de los cuales 12 se expresan también en roedores (Wisden y cols., 1992; Fritschy y Mohler, 1995). Los genes se clasifican en cinco clases según identidad de secuencia: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , y ρ 1-2 (MacDonald y Olsen, 1994). Todas las subunidades

se expresan en el tálamo con la excepción de α_6 , que se encuentra exclusivamente en cerebelo.

Los receptores GABA-B son metabotrópicos y al activarse inhiben la cadena de señalización de adenilato ciclasa/inositol-3-fosfato a través de proteínas G_i/G_o (Misgeld y cols., 1995; Kaupmann y cols., 1998; Kuner y cols., 1999). El receptor funcional es un heterodímero conformado por las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$, cada una de siete pasos transmembrana, codificadas por los genes $GABABR1$ y $GABABR2$, respectivamente, de los cuales se sabe que presentan *splicing* alternativo de sus ARNm (revisado en Bowery y cols., 2002). La localización de estos receptores puede ser tanto postsináptica como presináptica. En el primer caso la ubicación no se limita al espacio sináptico, sino que suele ser extrasináptica. En el segundo caso, los receptores GABA-B pueden estar presentes en terminales glutamatérgicas o GABAérgicas, y su activación está ligada a la inhibición de canales de calcio de alto umbral (Waldmeier y cols., 1994; Bonanno y cols., 1997; Deisz y cols., 1997).

Los receptores GABA-A extrasinápticos, compuestos por una subunidad δ , dos subunidades α (α_4 o α_6) y dos subunidades β (Jia y cols., 2005), median una inhibición tónica por concentraciones bajas extrasinápticas de GABA que se ha observado en cerebelo (Brickley y cols., 1996), hipocampo (Stell y Mody, 2002), estriado (Ade y cols., 2008) y tálamo (Cope y cols., 2005). Esta inhibición en el núcleo VB puede verse reducida por la activación de receptores D4 sin que se vea afectada la inhibición fásica (Yagüe y cols., 2013). Dado que hay evidencias de expresión de DA-R en astrocitos en algunas áreas del SNC (Khan y cols., 2001; Miyazaki y cols., 2004) y que la liberación de GABA glial en el núcleo VB difunde específicamente a los GABA-A extrasinápticos (Jiménez-González y cols., 2011), la DA podría estar inhibiendo la liberación de GABA glial o incrementando su recaptación.

Esta reducción de la inhibición tónica de GABA sobre el VB podría estar relacionada con el pasaje del patrón de disparo de *bursts* al de disparo tónico típico del estado despierto, lo que sugiere que la activación de receptores dopaminérgicos produce un efecto contrario al que se observa en el *síndrome de disritmia ThCo*. Estudios recientes han mostrado que la liberación fásica de GABA desde las terminales del núcleo reticular del tálamo recluta tanto receptores GABA-A sinápticos como extrasinápticos, por lo que

se supone que ambos tipos de receptores modulan la ritmicidad ThCo de manera simultánea y rápida (Rovó y cols., 2014).

En las neuronas de relevo talámicas se puede apreciar la activación de ambos receptores de GABA durante la liberación de GABA desde las terminales de las neuronas reticulares. Los receptores GABA-A median la inhibición que se observa inmediatamente luego de activar estas neuronas, un potencial hiperpolarizante con potencial de reversión de aproximadamente -75mV (Paré y cols., 1991; Soltesz y Crunelli, 1992). Esto precede otro potencial hiperpolarizante mediado por receptores GABA-B, de cinética más lenta y de mayor duración, que depende de un aumento en la conductancia de K^+ y revierte a aproximadamente -100mV (Paré y cols., 1991; Soltesz y cols., 1988).

La administración de agonistas del receptor GABA-B provoca un aumento en los ritmos de baja frecuencia (Liu y cols., 1992; Vergnes y cols., 1984; Vergnes y cols., 1997), mientras que la administración de antagonistas tiene el efecto contrario (Hosford y cols., 1992; Liu y cols., 1992; Marescaux y cols., 1992; Vergnes y cols., 1997).

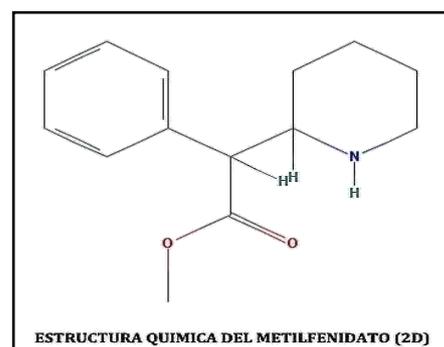
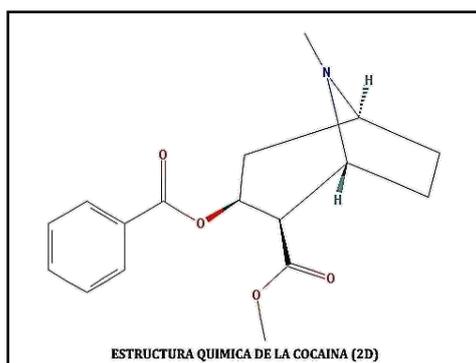
4. Psicoestimulantes

4.1. Adicción

Las adicciones se han considerado una enfermedad desde la década de 1960 (Dole y cols., 1966). Según NIDA (National Institute on Drug Abuse, EEUU) la adicción se define como una enfermedad cerebral que provoca la recaída crónica en el consumo de drogas, acompañada por comportamientos sociales compulsivos de búsqueda y consumo de drogas (Kreek, 2001) a pesar de las consecuencias negativas que esta conducta trae aparejadas. Asimismo, las adicciones son un grave problema de salud pública, con especial incidencia en la población adolescente. El consumo de psicoestimulantes como cocaína, MDMA y anfetaminas suele comenzar durante la adolescencia y tiene efectos nocivos en el desarrollo del SNC (Schramm-Sapyta y cols., 2004), además de ser capaz de provocar cambios neuropatológicos en múltiples áreas cerebrales (Cadet y cols., 2014).

En Argentina hay más de un millón de adolescentes que sufren problemas asociados con el consumo de drogas y se estima que el 2,6% de la población argentina de entre 12 y 65 años consumió cocaína al menos una vez en su vida (*Plan Nacional de Drogas, 2005-2007*). Entre la población argentina de 25 a 34 años se encuentran las tasas de mayor consumo de cocaína (5,8 %). En los demás grupos etarios, las tasas son menores: 4,5 % entre los que tienen 18 a 24 años, 3,1 % en el grupo de 35 a 49 años y 0,5 % y 0,4% en las personas de 50 a 65 años y de 12 a 17 años respectivamente (Observatorio argentino de drogas, 2010).

La Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC, *United Nations Office on Drugs and Crime*) estima que la prevalencia mundial de uso de cocaína es de 0,3-0,5 % para el rango etario de 15 a 64 años (entre 14,2 y 20,5 millones de personas; Naciones Unidas, 2011), y en 2009 se estimó que unas 15-39 millones de personas consumieron opioides, anfetaminas o cocaína (Degenhardt y Hall, 2012). La adicción a cualquiera de estas sustancias trae consecuencias negativas en los planos biológicos, psicológicos y sociales. Las manifestaciones clínicas de la adicción a drogas de abuso dependen de cambios drásticos en regiones del cerebro involucradas en los procesos de aprendizaje y recompensa (Cadet y Bisagno, 2013; Cadet y cols., 2014). A nivel psicológico el individuo adicto es incapaz de evitar la búsqueda y el consumo de la droga (Volkow y cols., 2012).



La cocaína es fuertemente adictiva debido a su corta vida media y a que sus propiedades de refuerzo pueden llevar al uso compulsivo. Los efectos agudos de su consumo incluyen euforia, aumento de la energía y del estado de alerta, todos relacionados con el aumento en los niveles de dopamina (DA) que provoca al inhibir su

recaptación por el transportador de DA (DAT) (Ritz y cols., 1987). Por otro lado, la sobredosis de cocaína puede inducir epilepsia, dolor de cabeza y accidentes cerebrovasculares (Nnadi y cols., 2005). El consumo continuado a largo plazo provoca ansiedad, depresión e hipersomnolencia (Warner, 1993), y se cree que puede guardar relación con alteraciones en varios sistemas de neurotransmisión (Koob y Volkow, 2010). A todo esto se suman efectos sobre los sistemas cardiovascular, respiratorio y de regulación térmica (Nnadi y cols., 2005). Los usuarios también sufren de déficits cognitivos en las funciones ejecutivas (Cadet y Bisagno, 2013), toma de decisiones, impulsividad, percepción visual, destreza manual, aprendizaje verbal y memoria (Nnadi y cols., 2005), típicos de un mal funcionamiento del lóbulo prefrontal (Goldstein y cols., 2004). En adictos se observa un aumento en los niveles de DAT y de recaptación de DA en el estriado ventral (Mash y cols., 2002), así como también se ha encontrado una mayor densidad del transportador de serotonina (SERT) en el nucleus accumbens y el estriado (Mash y cols., 2000).

La adicción a psicoestimulantes puede darse con drogas de uso ilegal, como la metanfetamina o la cocaína, o con drogas que se toman legalmente bajo receta médica. En este segundo grupo se encuentran el modafinilo y el metilfenidato (MPH; nombre comercial: Ritalina).

El modafinilo se utiliza en el tratamiento de la narcolepsia y los desórdenes de sueño (Ballon y Feifel, 2006; De la Herrán-Arita y García-García, 2013), así como también del Trastorno de Déficit de Atención con Hiperactividad (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, ADHD), ya que reduce los déficits cognitivos de los pacientes (Minzenberg y Carter, 2008). Este psicoestimulante también se utiliza en el tratamiento de adicción a otras drogas, como cocaína (Martínez-Raga y cols., 2008) y metanfetamina (Anderson y cols., 2012; Shearer y cols., 2009) mediante terapia de reemplazo, ya que su potencial adictivo es mucho menor (Jasinski, 2000). Esto implica que igualmente puede, en algunos casos, ser una droga de abuso en sí misma, sobre todo si tenemos en cuenta que permite reducir las horas de sueño, característica de gran utilidad para estudiantes y empresarios (Tannenbaum, 2012).

Por su parte el MPH es ampliamente utilizado para tratar parte de la población infantil y adolescente diagnosticada con ADHD ("Diagnosis and treatment of attention

deficit hyperactivity disorder (ADHD),” n.d.; Gilmore y Milne, 2001; Mott y cols., 2004), aunque también se utiliza para el tratamiento de depresión, narcolepsia, daño cerebral, cáncer, dolor y desórdenes cognitivos (Challman y Lipsky, 2000). Los efectos secundarios del uso de MPH, que suelen disminuir con el tiempo a niveles tolerables, incluyen insomnio, dolor estomacal, dolor de cabeza y anorexia (Firestone y cols., 1998; Rappley, 1997; Findling y Dogin, 1998). Más allá de su uso terapéutico, el MPH puede constituir una droga de abuso por vía nasal o intravenosa con efectos subjetivos similares a los proporcionados por cocaína (O’Brien, 1996; Volkow y cols., 1995). Se ha descrito un potencial abuso de MPH por parte de pacientes diagnosticados con ADHD (Biederman y cols., 1999; Chait, 1994) y se estima que la prevalencia de uso no terapéutico de MPH es de 5-10% en estudiantes de escuela secundaria y de 5-35% en estudiantes universitarios (revisado por Clemow y Walker, 2014). La toxicidad por sobredosis de MPH tiene efectos semejantes a la intoxicación por anfetamina, tales como euforia, delirios, alucinaciones, confusión y psicosis tóxica (Rappley, 1997), y presenta también síntomas motores como bruxismo y movimientos estereotípicos. Si bien hay autores que sostienen que la población juvenil tratada crónicamente con MPH tiene una menor predisposición al abuso de drogas estimulantes durante la adultez (Biederman y cols., 1999), efecto que también se ha observado en modelos animales (Carlezon y cols., 2003), otros sugieren lo contrario (Volkow y cols., 1995; Brandon y cols., 2001; Volkow e Insel, 2003) y afirman que el uso crónico de MPH puede tener efectos perjudiciales sobre el SNC (Morton y Stockton, 2000), tales como la pérdida del contenido de DA y la activación de la microglia en los ganglios de la base (Sadasivan y cols., 2012). Con respecto a los efectos de MPH sobre el tálamo, los pocos trabajos publicados sugieren que este estimulante altera la conectividad del tálamo con estructuras involucradas en la atención, la percepción visual y el control motor (Mueller y cols., 2014; Farr y cols., 2014)

Dada la importancia a nivel clínico y sociológico de las adicciones, la gran mayoría de las investigaciones sobre psicoestimulantes se basan en el potencial de las distintas drogas para generar un cuadro de adicción. Esto ha llevado a incontables avances en cuanto al conocimiento acerca de los circuitos de refuerzo positivo, de los cuales el más importante es el circuito mesocorticolímbico, regido por la inervación dopaminérgica (Ritz y cols., 1987; Wise y Bozarth, 1987; Koob, 1999; Volkow y Li, 2004).

Conjuntamente, se ha profundizado en los mecanismos neuronales (tanto a nivel de circuito como molecular) que determinan las distintas fases del proceso adictivo, como la tolerancia, la sensibilización, el condicionamiento, la dependencia y la abstinencia. En la expansión de esta rama de las Neurociencias el uso de animales de laboratorio juega un rol fundamental, dada la imposibilidad ética de experimentar con drogas de abuso en humanos.

Sin embargo, muy pocos trabajos han abordado el efecto de los estimulantes como cocaína y MPH sobre el sistema ThCo somatosensorial, aunque se ha descrito que puede ser afectado por abuso de drogas en humanos (Tomasi y cols., 2007). Recientemente también se han descrito interacciones entre MPH y alcohol en el estriado dorsal de ratón (Crowley y cols., 2014).

4.2. Efectos de la cocaína y el metilfenidato sobre el sistema tálamocortical somatosensorial

La cocaína ejerce sus efectos sobre el tálamo somatosensorial a través del aumento en los niveles sinápticos de DA en los circuitos ThCo somatosensoriales, seguido por el aumento de norepinefrina (NE) y serotonina (5-HT) (Wilson y cols., 1976; Wise y Bozarth, 1987; Rutter y cols., 1998), debido a la inhibición de los transportadores encargados de la recaptación de DA (DAT), NE (NET) y 5-HT (SERT) (Glowinski y Axelrod, 1966; Ross y Renyi, 1969; Kuczenski y Segal, 1997). El MPH, a diferencia de cocaína, bloquea DAT y NET, pero no afecta el SERT (Segal y Kuczenski, 1999; Han y Gu, 2006).

El consumo excesivo de cocaína puede causar convulsiones y delirios acompañados con alucinaciones (Hanson y cols., 1999; Devlin y Henry, 2008), manifestaciones extensamente relacionadas con un procesamiento ThCo alterado (Behrendt, 2006). Los efectos de la cocaína sobre la transmisión GABAérgica del sistema ThCo descritos por nuestro grupo (Urbano y cols., 2009; Bisagno y cols., 2010) son similares a los previamente descritos para el *síndrome de disritmia ThCo* (Llinás y cols., 1999; Jeanmonod y cols., 2003; Llinás y cols., 2005), que presenta coherencia anormal entre bajas y altas frecuencias a nivel ThCo. La presencia de bajas frecuencias en individuos

despiertos provocaría el procesamiento sensorial anormal (Llinás y cols., 2005; Behrendt, 2006).

Por su parte, el MPH normaliza la actividad de bajas frecuencias en el EEG (Clarke y cols., 2003), lo que sugiere que el núcleo reticular del tálamo está involucrado en la etiología de ADHD. Se ha observado que la administración de una sola dosis de MPH en ratas bloquea la transmisión GABAérgica del núcleo reticular a través de la activación de receptores D4 (Florán y cols., 2004; Erlij y cols., 2012). Los efectos de la administración repetida de MPH sobre la liberación de GABA en el núcleo reticular del tálamo aún no se conocen.

5. Inervación monoaminérgica del sistema tálamocortical somatosensorial de ratón.

5.1. Dopamina

La dopamina (DA) es un neurotransmisor involucrado en la regulación de un amplio rango de funciones fisiológicas, desde el control coordinado de los movimientos y secreción hormonal al comportamiento emocional y motivacional (Hornykiewicz, 1966; Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Tritsch y Sabatini, 2012). Es central para el funcionamiento de los centros de recompensa y placer del cerebro, que han cobrado gran relevancia debido a las consecuencias graves que devienen de su disfunción, tales como la adicción a drogas de abuso y la obesidad.

Se conocen cuatro vías dopaminérgicas bien establecidas: 1) la vía nigroestriatal, cuyos somas se encuentran en la SNpc y proyectan al estriado dorsal, que da cuenta del 80% de las neuronas dopaminérgicas (Moore y Bloom, 1978; Joel y Weiner, 2000); 2) la vía mesolímbica, que se origina en el área tegmental ventral (ATV) y proyecta a áreas límbicas como el núcleo accumbens (NAc), el tubérculo olfatorio, la amígdala y el hipocampo (Moore y Bloom, 1978; Swanson, 1982), y se encuentra involucrada en la motivación, recompensa, adicciones y actividad motora (Le Moal y Simon, 1991); 3) la vía mesocortical, también originada en el ATV, cuyas terminales alcanzan estructuras corticales (Moore y Bloom 1978, Swanson, 1982) y que se encarga de controlar

funciones cognitivas y de aprendizaje (Le Moal y Simon 1991); 4) la vía tuberoinfundibular, que parte del hipotálamo hacia la hipófisis y regula las funciones neuroendocrinas (Moore y Bloom 1978).

Sin embargo, en primates se ha encontrado que también existe un sistema dopaminérgico talámico (Sánchez-González y cols., 2005; García-Cabezas y cols., 2007). Un estudio comparativo entre rata y mono muestra que el tálamo de rata presenta marca inmunohistoquímica para DAT en el núcleo epitalámico de la habénula lateral y en el reticular (ventral), con baja densidad de DAT en el paraventricular de la línea media, el ventromedial, el ventrolateral y el mediodorsal, mientras que el cerebro de mono tiene una marca de DAT más extendida, lo que sugiere un sistema dopaminérgico especialmente desarrollado en primates, con fuerte innervación sobre interneuronas (García-Cabezas y cols., 2009). En cualquiera de los dos casos, el núcleo Ventrobasal presenta una marca de DAT muy leve, mientras que la del reticular es intensa (García-Cabezas y cols., 2009).

Los receptores de DA se acoplan a proteína G y tienen siete pasos transmembrana. Hay cinco tipos de receptores para DA (D1-5): D1 y D5 (D5 en humanos, D1b en rata) pertenecen al grupo “tipo D1”, asociado a la estimulación de AC mediante $G_{s\alpha}$ o $G_{olf\alpha}$, mientras que D2-4 pertenecen al grupo “tipo D2”, asociado a la inhibición de la formación de AMPc.

Los receptores D1 modulan el calcio intracelular mediante la estimulación de la fosfolipasa C (vía IP3), aunque también se ha descrito la activación de PKA. En estriado de rata aumentan la corriente de calcio por canales tipo L, probablemente al provocar fosforilación de los canales por parte de PKA. También disminuyen la corriente mediada por canales de tipo N y P/Q, quizá por activación de una fosfatasa por parte de PKA (revisado por Missale y cols., 1998).

Dentro del grupo de receptores de tipo D2, los D2 aumentan los niveles de calcio por hidrólisis del fosfatidilinositol, mientras que los D3 y D4 no lo hacen. Los receptores de tipo D2 pueden inhibir la entrada de calcio externo por canales, ya sea por modulación de canales de K^+ o por interacción con proteína G. Al ser por lo general autorreceptores, esto suele inhibir la liberación de DA (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994).

El tálamo de los roedores presenta una innervación dopaminérgica difusa del ATV y la sustancia nigra (Groenewegen, 1988; Papadopoulos y Parnavelas, 1990; García-Cabezas y cols., 2007, 2009;) y niveles moderados de receptores de DA (Weiner y cols., 1991; Khan y cols., 1998). Si bien hay estudios acerca de la expresión de receptores de DA y aferencias DAérgicas en el tálamo (Groenewegen, 1988; Papadopoulos y Parnavelas, 1990; Camps y cols., 1990; Weiner y cols., 1991; Huang y cols., 1992; Mrzljak y cols., 1996; Khan y cols., 1998; Mijster y cols., 1999), no se han centrado en el VB, aunque a nivel electrofisiológico se ha encontrado que la DA aumenta la excitabilidad de neuronas ventrobasaes de rata tanto a través de receptores D2 (facilita el disparo de potenciales de acción) como mediante los D1 (inducen despolarización del potencial de membrana) (Govindaiah y cols., 2010). No se ha descrito efecto de la DA sobre los potenciales miniatura inhibitorios, pero en rata provoca una disminución de la inhibición tónica mediada por los receptores GABA-A extrasinápticos (Yagüe y cols., 2013). Aunque la acción de la DA no se debe a un menor contenido de GABA en las vesículas sinápticas, se desconoce la localización de los receptores de DA responsables de este efecto. Se supone que los receptores de DA están ubicados en los astrocitos, que constituyen una fuente de GABA ambiental en el núcleo VB (Jiménez-González y cols., 2011).

El núcleo reticular recibe aferencias inhibitorias del *globus pallidus* que contienen receptores D4 presinápticos cuya activación reduce la inhibición sobre el núcleo reticular (Florán y cols., 2004; Gasca-Martinez y cols., 2010).

5.2. Serotonina

El núcleo del rafe dorsal es la principal fuente de 5-HT, con proyecciones difusas a neocorteza, tálamo, hipocampo, tectum y cerebelo (Ungerstedt, 1971; Azmitia y Segal, 1978; Björklund y cols., 1971; Conrad y cols., 1974; Moore y cols., 1978; Shinnar y cols., 1975; Steinbusch, 1981; Vertes, 1991; Jacobs y Azmitia, 1992; Kerr y Bishop, 1991). Este neurotransmisor participa del control de la presión sanguínea, la temperatura corporal, el apetito, la liberación de prolactina y otras hormonas, la percepción del dolor y el comportamiento emocional. Existen catorce receptores de 5-HT, clasificados en siete familias (5-HT₁₋₇) y acoplados a proteína G con la salvedad del receptor 5-HT₃, que

es ionotrópico (revisado por Millan y cols., 2008): los receptores 5-HT₁ inhiben la adenilato ciclasa a través de la activación de proteínas G_{i/o}; los receptores 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ activan la adenilato ciclasa a través de proteína G_s; los receptores 5-HT₂ activan la fosfolipasa C a través de proteína G_{q/11}; se cree que los 5-HT_{5a} actúan acoplados a proteínas G_{i/o}.

Las proyecciones serotoninérgicas sobre el tálamo provienen de las neuronas del rafe dorsal y rafe medial del pons rostral y mesencéfalo (Dahlström y Fuxe, 1964; Peschanski y Besson, 1984; Gonzalo-Ruiz y cols., 1995; Vertes y Martin, 1988; Morin y Meyer-Bernstein, 1999; Vertes, 1991; Vertes y cols., 1999;). El núcleo reticular del tálamo recibe aferencias serotoninérgicas del rafe dorsal y del núcleo supralemniscal (Rodríguez y cols., 2011).

En el núcleo reticular de gato, la aplicación local de 5-HT suprime el disparo de *bursts* (y por lo tanto promueve el disparo de potenciales de acción en forma tónica) al provocar una disminución en la corriente de potasio (McCormick y Pape, 1990a; McCormick y Wang, 1991). Este efecto se bloquea con ketanserina, antagonista 5-HT_{2A} (McCormick y Wang, 1991).

La 5-HT modula directamente el disparo de las neuronas Ventrobasales, aunque también hay evidencias de modulación indirecta, ya sea por facilitación de la respuesta a aminoácidos excitatorios (Eaton y Salt, 1989), por inhibición de la excitación producida por acetilcolina (Andersen y Curtis, 1964; Eaton y Salt, 1989) o mediante la modificación de la dependencia de voltaje de la I_H (Lee y McCormick, 1996). Si bien en ratas Long Evans no se ha observado efecto alguno de la aplicación exógena de 5-HT sobre las corrientes evocadas mediadas por GABA-A en neuronas Ventrobasales (Munsch y cols., 2003), en ratas Wistar sí se ha encontrado que a través de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} hay aumento y disminución, respectivamente, de las corrientes tónicas mediadas por receptores GABA-A (Cavaccini y cols., 2012), probablemente debido a la activación de distintas vías de transducción de señales o a una distribución diferenciada de los dos tipos de receptores serotoninérgicos (los autores proponen la posibilidad de que los 5-HT_{2C} tengan una distribución postsináptica y los 5-HT_{2A}, presináptica).

En roedores tanto los receptores 5-HT_{1A} como 5-HT_{2A} se expresan en gran medida en las neuronas del núcleo reticular del tálamo (Li y cols., 2004; Bonnín y cols., 2006; Rodríguez y cols., 2011). Los 5-HT_{1A} se encuentran principalmente en los somas y dendritas proximales mientras que los 5-HT_{2A} se expresan en los somas en menor medida pero son más abundantes en las dendritas de calibre pequeño (Rodríguez y cols., 2011).

Durante el desarrollo de la corteza somatosensorial en roedores hay una innervación densa y transitoria (días postnatales 1 al 10 en ratón; Fujimiya y cols., 1986) de fibras serotoninérgicas que delinean los barriles y acompañan las proyecciones provenientes del núcleo VB (D'Amato y cols., 1987; Blue y cols., 1991).

En la figura 5 se muestra un esquema en el que se resume cómo estarían representadas las aferencias dopaminérgicas y serotoninérgicas sobre el tálamo y la corteza somatosensorial de ratón.

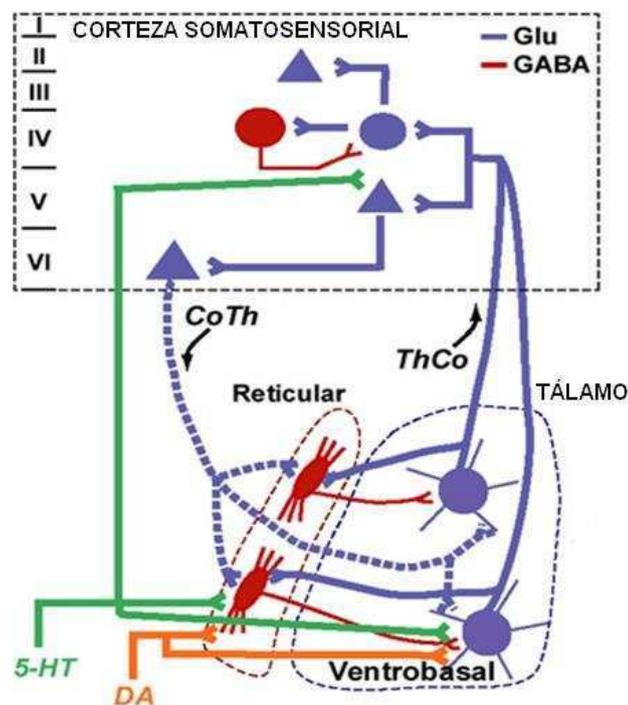


Figura 5. Aferencias de dopamina (DA) desde el VTA y la SN y serotonina (5-HT) desde el núcleo dorsal del Rafe sobre las neuronas de la corteza somatosensorial, del núcleo Ventrobasal y del núcleo reticular del tálamo. Las sinapsis glutamatergicas (Glu) se indican en azul y las GABAérgicas en rojo. (Eaton y Salt, 1989; Senft y Woolsey, 1991; García-Cabezas y cols., 2009; Govindaiah y cols., 2010; Rodríguez y cols., 2011);).

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los mecanismos subyacentes al estado de disritmia tálamocortical previamente descrito en ratones tratados con cocaína (Urbano y cols., 2009) para dilucidar las posibles causas biológicas de los profundos déficits cognitivos y atencionales presentes en pacientes adictos a la cocaína.

Objetivos específicos

- Analizar y comparar el impacto de la administración aguda y sub-crónica de cocaína y metilfenidato sobre la transmisión GABAérgica de neuronas del núcleo reticular del tálamo sobre neuronas del núcleo Ventrobasal.
- Estudiar el rol funcional de los receptores de serotonina 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/2C} en los cambios inducidos por la administración de cocaína (aguda y sub-crónica) en la sinapsis GABAérgica de las neuronas del núcleo reticular del tálamo.

METODOLOGÍA

1. Animales

Se utilizaron ratones machos periadolescentes (entre 17 y 30 días de edad) de la cepa C57BL/6 obtenidos del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). En los experimentos que así lo especifican, se utilizaron ratones de la cepa 129Sv/Ev, ya sean *wild type* (WT) o *knockout* (KO) para el receptor 5-HT_{2A} (estos últimos fueron generosamente cedidos por el Dr. Jay Gingrich de la Universidad de Columbia, E.E.U.U., a través de la Dra. Noelia Weisstaub del Grupo de Neurociencia de Sistemas, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA). Los animales se trataron según las normas de cuidado de animales de laboratorio de CONICET (2003), que fueron determinadas de acuerdo a las directivas OLAW/ARENA (NIDA, EEUU). El acceso a comida y agua fue *ad libitum* y el ciclo luz/oscuridad fue de 12h/12h, con las luces encendidas a las 7:00.

Los ratones KO para el receptor 5-HT_{2A} presentan una disrupción en el gen *htr2a*, que codifica para dicho receptor, específicamente un gen de neomicina fusionado a elementos que bloquean la transcripción inserto en la región 5' no codificante (Weisstaub y cols., 2006). Estos ratones fueron generados en la cepa 129/SvEv a partir de células madre murinas y posteriores cruces en la misma cepa hasta obtener animales 5-HT_{2A} *-/-*, que son viables y pueden cruzarse entre ellos. Para asegurar la línea transgénica el laboratorio de la Dra. Weisstaub realiza genotipificaciones periódicas de los animales por PCR.

2. Administración de psicoestimulantes *in vivo*

Tanto el clorhidrato de cocaína (CC) como el clorhidrato de metilfenidato (MPH) se administraron disueltos en solución fisiológica (NaCl 0,9%) en forma de *binge* (Spangler y cols., 1993; Urbano y cols., 2009; Bisagno y cols., 2010): tres inyecciones *i.p.* de 15mg/kg cada una, espaciadas entre sí por una hora. Esta forma de administración busca imitar el patrón de consumo humano de “uso fuerte y desplome” (*binge and crash*) que suelen presentar los usuarios de psicoestimulantes con la intención de mantener la sensación de euforia por más tiempo, ya que los efectos placenteros

desaparecen antes de que disminuyan significativamente los niveles de la droga en sangre (NIDA, 2010, 2013). Se consideró agudo el protocolo de administración de un único *binge* y sub-crónico el de administración de un *binge* por día durante tres o cuatro días seguidos. Los animales control recibieron volúmenes similares de solución fisiológica (aproximadamente 10µl por gramo de peso) siguiendo los mismos cronogramas de inyección.

3. Obtención de rodajas

Los animales fueron anestesiados con tribromoetanol (250mg/kg, i.p.) una hora o 24 horas luego de recibir la última inyección del protocolo de administración correspondiente, tras lo que se los perfundió intracardiácamente con 15-20ml de una solución fría rica en antioxidantes y baja en sodio (en mM: 200 sacarosa, 2,5 KCl, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 20 glucosa, 0,4 ácido ascórbico, 2 piruvato de sodio, 1 ácido kinurénico, 1 CaCl₂ y 3 MgSO₄) mantenida con burbujeo constante de carbógeno (5% CO₂ - 95% O₂) a pH 7,3. La combinación de bajas concentraciones de Na⁺ y Ca²⁺, sumadas a la baja temperatura y al bloqueo de receptores de glutamato por el ácido kinurénico, permite prevenir la muerte neuronal por hipoxia/excitotoxicidad. Luego de la perfusión se los decapitó y se disecaron los cerebros en solución de corte helada (en mM: 2,5 KCl, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 10 glucosa, 0,5 ácido ascórbico, 3 myo-inositol, 2 piruvato de sodio, 250 sacarosa, 10 MgCl₂, 1 CaCl₂). Se retiró el cerebelo con un corte coronal y se pegó el cerebro sobre una plataforma para la obtención de rodajas coronales de 250-350µm de espesor mediante un vibrátomo (Campden Instruments, Reino Unido). Una vez obtenidas, las rodajas se incubaron por media hora a 35°C en líquido céfalo-raquídeo artificial (aCSF por su nombre en inglés; en mM: 2,5 KCl, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 10 glucosa, 0,5 ácido ascórbico, 3 myo inositol, 2 piruvato de sodio, 125 NaCl, 3 MgCl₂, 0,5 CaCl₂). Luego de la incubación se esperó a que las rodajas llegaran a temperatura ambiente (20-24°C) para comenzar los registros.

Para los experimentos de respuestas evocadas, las rodajas se obtuvieron tras pegar los hemisferios por la línea media sobre una plataforma de acrílico, inclinados 10° respecto de la horizontal y en un ángulo de 55° respecto de la vertical. Este tipo de corte permite maximizar la conectividad entre la corteza somatosensorial y los núcleos

talámicos, así como entre los núcleos reticular y VB (Llinás y cols., 2002; Urbano y cols., 2009).

4. Dispositivos para los registros de *patch-clamp*

A continuación se describe brevemente la técnica de *patch-clamp*. Los experimentos de electrofisiología se realizaron en un *set up* compuesto por un microscopio vertical de transiluminación Olympus BX50WI, dos cabezales (pre-amplificadores) manejados por micromanipuladores para el posicionamiento de pipetas y electrodos de estimulación, un sistema de perfusión por bomba peristáltica para la recirculación de solución de registro carbogenada (aCSF suplementado con bloqueantes detallados en las secciones subsiguientes) y un sistema de adquisición y digitalización de señales (Axon Instruments, Molecular Devices). Tanto el microscopio como los cabezales, micromanipuladores y bomba peristáltica, rodeados por una jaula de Faraday, que minimiza el ruido eléctrico ambiente, se ubican sobre una mesa antivibratoria. El microelectrodo de registro se llena con la solución intracelular y se conecta a un pre-amplificador que amplifica la señal, actúa como un primer filtro para el ruido y se conecta también al electrodo neutro en el baño donde se encuentra el corte en estudio. Este cabezal se conecta a un amplificador MultiClamp 700B que permite amplificar aún más la señal y filtrarla para limpiarla de ruido de alta frecuencia. Además, el amplificador controla la inyección de corriente y contiene los circuitos de retroalimentación necesarios para la fijación de voltaje. A su vez, el amplificador se conecta a un digitalizador Digidata 1440A que permite digitalizar el registro y se conecta a una computadora personal donde se adquieren y procesan los datos.

Se realizaron registros de corrientes intracelulares totales en somas de neuronas del núcleo VB del tálamo mediante la técnica fijación de voltaje por *patch-clamp* en configuración de célula entera (*whole-cell*).

Las pipetas de *patch* se obtuvieron por estiramiento de capilares de vidrio de borosilicato con filamento interno (Sutter Instrument, EEUU) y se llenaron con una solución de alto contenido de Cs⁺ para bloquear los canales de potasio dependientes de voltaje (en mM: Hepes 40, TEA-Cl 20, Fosfocreatina 12, EGTA 0,5, Mg-ATP 1, Li-GTP 1, MgCl₂ 1, CsCl 110) suplementada con 1mM QX-314 (bromuro de N-(2,6-

Dimetilfenilcarbamoilmetil)trietilamonio), una lidocaína cuaternaria modificada que bloquea intracelularmente los canales de sodio sensibles a voltaje. Por dentro de las pipetas se inserta un alambre de plata previamente clorurado con lavandina comercial (NaClO 5,5%), de forma de que el alambre se convierte en un electrodo de Ag/AgCl y pueda formar la cupla rédox con la solución interna de CsCl, lo que proporciona continuidad eléctrica entre el preamplificador y la pipeta. El circuito se cierra con otro electrodo de Ag/AgCl sumergido en el aCSF (en mM: 2,5 KCl, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 10 glucosa, 0,5 ácido ascórbico, 3 myo inositol, 2 piruvato de sodio, 125 NaCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂) que baña las rodajas y conectado al mismo preamplificador que lleva la pipeta de *patch*. La resistencia de las pipetas, medida en aCSF, fue de entre 2 y 5MΩ. Previo a obtener el sello el potencial de punta de la pipeta fue neutralizado electrónicamente.

5. Técnica de *patch-clamp*. Configuración de célula entera

Se localiza la zona correspondiente al núcleo VB del tálamo a través de un objetivo 4x y luego se buscan neuronas de apariencia saludable con el objetivo de inmersión 40x. Se hace descender la pipeta de *patch* sobre el tejido con una ligera presión positiva para mantener limpio el extremo de la pipeta y visualizar el momento en el que la pipeta se encuentra próxima a la membrana celular. Luego se libera la presión positiva y se ejerce una suave presión negativa a fin de sellar la membrana con la punta de la pipeta. La resistencia del sello debe alcanzar como mínimo 1GΩ para asegurar la calidad de la fijación de voltaje. Mediante pulsos cortos de presión negativa y de corrientes capacitivas superiores a las que la membrana celular puede compensar, se provoca una ruptura en la porción de membrana que se invaginó dentro de la pipeta, por lo que el interior de la pipeta de *patch* y el interior celular forman un continuo, lo que se denomina como configuración de célula entera (*whole-cell*). Por difusión, a los pocos minutos el citosol es reemplazado (“lavado”) por la solución intracelular de la pipeta.

El potencial de membrana fijado (*holding*) a través de la pipeta de *patch* fue de -70mV. Se compensó tanto la capacitancia (25-40 pF) como la resistencia en serie entre la pipeta y la célula (6-12 MΩ, previo a su compensación electrónica en un 20-30%).

6. Aplicación localizada de serotonina

La serotonina (5-HT) se aplicó de forma localizada usando un pulso de presión (*puff*). La 5-HT se disolvió en la misma solución de registro en la que se bañaron las rodajas para cada experimento (típicamente, aCSF suplementado con bloqueantes de receptores de glutamato y, en el caso de registrar corrientes espontáneas, también tetrodotoxina, TTX) con el agregado de ácido ascórbico 0,1mM a fin de prevenir su oxidación. Las soluciones de 5-HT se prepararon cada día inmediatamente antes de su uso para garantizar la concentración deseada.

Las pipetas utilizadas para la aplicación localizada fueron idénticas a las que se emplearon para la técnica de *patch-clamp*, y la aplicación se realizó por presión de nitrógeno (12psi) controlada por un Picospritzer II (General Valve Corporation, EEUU) a $\sim 50\mu\text{m}$ del soma de las neuronas ventrobasaes registradas. Durante cada aplicación se monitoreó que no hubiese variaciones en la presión de nitrógeno.

7. Registros de corrientes espontáneas miniatura

Mediante el agregado en el baño de TTX ($3\mu\text{M}$), bloqueante de canales de sodio sensibles a voltaje, se impide el disparo de potenciales de acción espontáneos de las neuronas presentes en la rodaja. Sin embargo, esto no impide la liberación espontánea de GABA por parte de las neuronas del núcleo Reticular del tálamo, lo que se registra en la post-sinapsis (neuronas del núcleo VB) como corrientes miniatura (denominadas minis cuando se registran eventos espontáneos en presencia de TTX). La naturaleza GABAérgica de los minis se disecó farmacológicamente mediante el agregado en la solución de registro de los bloqueantes de la transmisión glutamatérgica 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, antagonista de receptores AMPA/Kainato, $20\mu\text{M}$) y ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico (DL-AP5, antagonista de receptores NMDA, $50\mu\text{M}$). Además, los minis se definieron como dependientes del receptor GABA-A, ya que se bloquean por el agregado de bicuculina o picrotoxina ($50\mu\text{M}$). Los registros de minis se realizaron en fijación de voltaje (-70mV) durante 2:30 minutos, únicamente en células con una corriente de fuga (*leak*) menor a 500pA y con una resistencia de acceso menor a $10\text{M}\Omega$, ya que de lo contrario se dificulta distinguir los minis del ruido.

El análisis de los registros obtenidos se realizó con el programa MiniAnalysis (Synaptosoft, EEUU). Para cada registro se crearon gráficos de probabilidad acumulada tanto para la amplitud como para el intervalo entre eventos (esto es, frecuencia⁻¹) que luego se ajustaron a la siguiente ecuación exponencial: $y = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot x)$, donde y es la probabilidad acumulada, x es amplitud o intervalo entre eventos, y los parámetros y_0 , a y b son calculados por el programa utilizado para el ajuste (SigmaPlot; Systat Softwares, EEUU). De los ajustes se obtuvieron los valores de las medianas (valor de x para $y=0,5$), que se tomaron como variable para las comparaciones estadísticas.

En los experimentos de aplicación localizada (*puff*) de 5-HT (en presencia o en ausencia de bloqueantes/agonistas serotoninérgicos) los datos de corrientes miniatura se analizaron de la siguiente manera: se dividió el registro en intervalos de 15 segundos y se calculó la frecuencia de minis de cada intervalo. Se tomó como frecuencia pre-*puff* el promedio de frecuencias para los primeros cuatro intervalos (0 a 1:00), como frecuencia durante el *puff* el promedio de los intervalos cinco y seis (1:00 a 1:30) y como frecuencia post-*puff*, el promedio de los cuatro últimos intervalos (1:30 a 2:30). Para cada registro las frecuencias durante el *puff* y post-*puff* se relativizaron a la frecuencia pre-*puff*. Los resultados se muestran como porcentaje de inhibición de la frecuencia pre-*puff*.

La efectividad espacial de la utilización del *puff* para administrar drogas de forma localizada sobre la sinapsis en estudio se corroboró mediante la aplicación de pulsos de Cd²⁺ (1mM), que al bloquear los canales de calcio presinápticos elimina la expresión de corrientes miniatura en las neuronas postsinápticas ventrobasales (Figura 6A). Estos resultados indican claramente que durante los experimentos de *puff*, las drogas aplicadas al realizar los registros de *patch-clamp* alcanzan tanto las áreas pre- (Figura 6A) como postsinápticas (Figura 6B y C) en estudio.

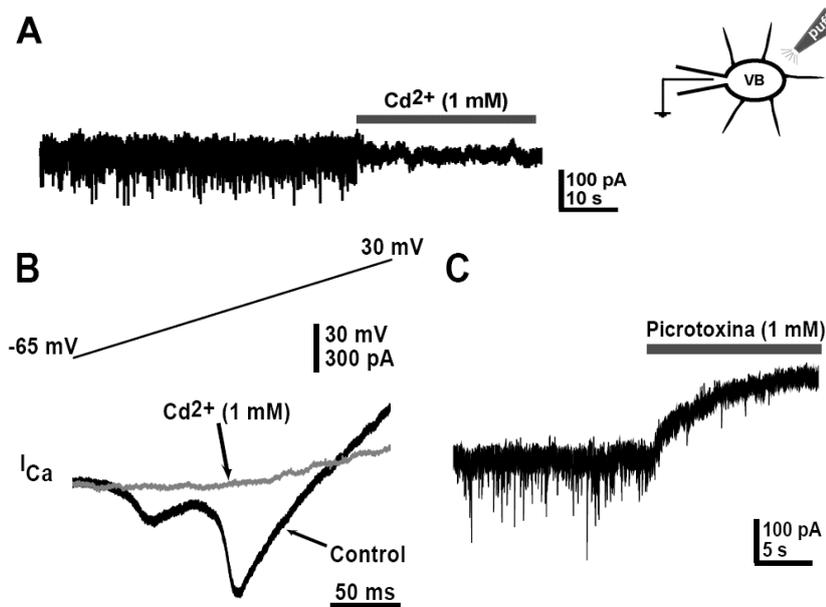


Figura 6. Control de la efectividad espacial de la técnica de *puff* para la administración localizada de drogas. (A) La aplicación por *puff* de Cd²⁺ (1mM), bloqueante inespecífico de canales de calcio, bloquea la liberación de GABA que media de corrientes miniatura GABAérgicas y (B) de corrientes de calcio a través de canales tipo T y tipo P/Q en neuronas del núcleo Ventrobasal del tálamo. (C) La aplicación por *puff* de picrotoxina (1mM), bloqueante de receptores GABA-A, también inhibe la expresión de corrientes miniatura GABAérgicas en neuronas Ventrobasales.

8. Registros de corrientes evocadas

8.1. Corrientes inhibitorias postsinápticas evocadas

En el núcleo VB también se estudiaron las corrientes inhibitorias postsinápticas evocadas (*evoked inhibitory post-synaptic currents, IPSCs*) por el disparo de potenciales de acción de los axones GABAérgicos procedentes del núcleo reticular mediante estimulación extracelular. Para ello, se ubicó en la zona limitante del núcleo reticular con el núcleo VB (Zhang y cols., 1997), un electrodo de estimulación concéntrico (FHC Inc, EEUU) con el que se aplicaron pulsos pareados o trenes de diez pulsos (en ambos casos, a 10Hz o 40Hz) de 40-200 μ s de duración y 200-1000 μ A de amplitud, en presencia de los bloqueantes glutamatérgicos DL-AP5 (50 μ M) y CNQX (20 μ M) y con el

potencial de membrana fijado en -70mV . Dado que usamos una solución intracelular con una alta concentración de Cl^- , las IPSCs tuvieron una polaridad negativa (potencial de reversión de los canales asociados a los receptores de GABA-A $\sim -35\text{ mV}$). Se confirmó que las corrientes fueran dependientes de receptores GABA-A tras la aplicación de bicuculina ($50\ \mu\text{M}$) en la solución de registro (Figura 7). La amplitud de las corrientes y la carga se cuantificaron con el programa Clampfit-pClamp 10.2 (Axon Instruments).

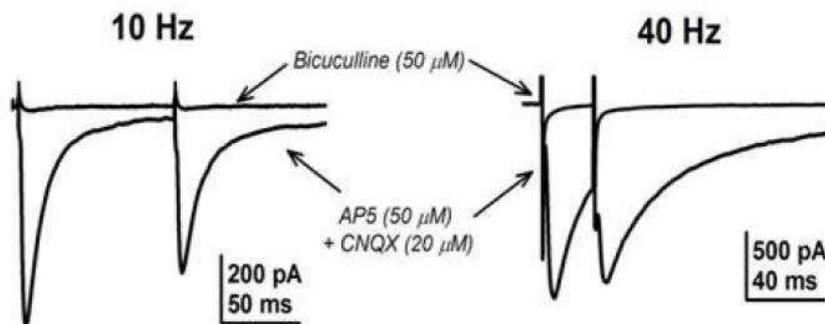


Figura 7. Corrientes evocadas en neuronas del núcleo Ventrobasal por estimulación por pulsos pareados del núcleo Reticular. El bloqueo de las corrientes por aplicación de bicuculina indica que están mediadas por receptores GABA-A.

En el caso de la estimulación pareada, el cociente entre la amplitud de la corriente evocada por el segundo pulso sobre la corriente evocada por el primero es una medida usada clásicamente para inferir cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisor de la presinapsis. Si la probabilidad de liberación es alta, con el primer pulso se fusionará un número de vesículas tal que al llegar el segundo pulso no habrá tantas vesículas disponibles para fusionarse, por lo que el cociente será menor a 1, fenómeno conocido como “depresión sináptica”. En el caso de que la probabilidad de liberación sea baja, el calcio que ingresa en la presinapsis con el segundo pulso se suma al calcio “residual” que había entrado con el primero, lo que permite una mayor liberación (del Castillo y Katz, 1954; Urbano y cols., 2003), fenómeno conocido como “facilitación”.

En cuanto a la estimulación por trenes, cada registro se dividió en tres partes: la línea de base (período de tiempo previo al primer estímulo de cada tren de pulsos); el tren en sí mismo (250ms a partir del primer pulso para trenes a 40Hz y 1s para los de 10Hz), durante el que se evaluó la carga evocada por la estimulación (área bajo la curva respecto de la línea de base); y el período posterior al tren hasta la finalización del registro, del que se midió la corriente (respecto de la línea de base), correspondiente a la liberación asincrónica.

8.2. Corrientes de calcio

Con el fin de medir las corrientes de calcio mediadas por canales tipo T y P/Q, se utilizó un protocolo que consiste en una rampa de voltaje de 500ms, desde -90mV hasta +50 mV. De esta manera se activan secuencialmente los canales tipo T, de bajo umbral de activación, y los P/Q, de alto umbral, lo que permite calcular ambas corrientes sin que sufran *rundown* (esto es, una disminución progresiva en la amplitud de las corrientes que suele estar asociada al proceso de diálisis de componentes intracelulares durante la técnica de *whole-cell patch-clamp*; Bisagno y cols., 2010; Urbano y cols., 2009). En algunos experimentos se evocaron las corrientes de calcio mediante el uso de pulsos cuadrados despolarizantes. Las corrientes se cuantificaron con el programa Clampfit-pClamp 10.2 (Molecular Devices, EEUU).

9. Registros en fijación de corriente (*current clamp*)

Para el estudio de los patrones de descarga de las neuronas del núcleo reticular del tálamo se utilizó la técnica de *patch-clamp* previamente descrita en configuración de célula entera con fijación de corriente (*current-clamp*). La solución de la pipeta de *patch* fue de alto K⁺ (en mM: gluconato de potasio 110, KCl 30, Hepes 10, fosfocreatina 10, EGTA 0,2, Mg-ATP 2, Li-GTP 0,5, MgCl₂ 1). Sólo se obtuvieron registros de neuronas cuyo potencial de reposo estuviera en la franja de -55 a -65 mV. La caída de resistencia de membrana en reposo se compensó automáticamente con el control de *Bridge* del

amplificador. Durante el experimento se utilizaron rampas de 5 segundos de duración y una pendiente de $100 \text{ pA} \cdot \text{s}^{-1}$.

10. Actividad locomotora

Tanto la cocaína (CC) como el metilfenidato (MPH) son drogas que se sabe pueden provocar un aumento de la actividad locomotora. Para medir esta variable se realizaron los experimentos en la sala de conducta del Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA), que cuenta con paneles acrílicos opacos con los que se puede armar campos abiertos de exploración (arenas) de 19cm x 40cm x 40cm. La sala está equipada con regulador de luz y con una cámara que abarca la imagen de cuatro arenas a la vez, conectada con una computadora situada en una sala contigua y equipada con el programa Ethovision XT7.0 (Noldus, Países Bajos), que permite automatizar la detección de los ratones y cuantifica la distancia recorrida. Los animales fueron trasladados en sus propias jaulas desde la sala de tránsito del ININFA a la sala de conducta la noche anterior a los experimentos para su aclimatación, ya que la sala cuenta con ciclador de luz y control de temperatura ambiente.

Los ratones recibieron inyecciones de CC, MPH o solución salina según el protocolo de *binge* y la actividad locomotora se registró durante los 30 minutos previos a la primera inyección (línea de base) y durante todo el protocolo de administración, hasta 1h posterior a la última inyección. Dentro de las arenas, durante todo el protocolo de inyección, los animales no tuvieron acceso a comida ni agua. Una vez finalizado el registro de actividad locomotora, los animales fueron devueltos a sus jaulas y se limpiaron las arenas en detalle para proseguir con el grupo siguiente. Típicamente en un mismo día se realizaron los registros de dos grupos de cuatro ratones cada uno, el primero a la mañana (con comienzo a las 9:00) y el segundo por la tarde (comienzo a las 13:00), y los registros de un mismo experimento se realizaron en días consecutivos hasta finalizar con la camada de ratones. Se tuvo especial cuidado en balancear los grupos experimentales en las arenas y en los turnos mañana y tarde para evitar tendencias debidas a la posición de una arena o al ritmo circadiano de los ratones.

11. Experimentos bioquímicos

11.1. Obtención y cuantificación de proteínas totales del tálamo de ratón

Se realizó la disección manual bajo lupa (aumento 15x) sobre una platina metálica inmersa en hielo de los núcleos reticular y VB (Figura 8) a partir de rodajas de 350 μ m de espesor, obtenidas con la misma metodología que las destinadas a experimentos electrofisiológicos. El tejido obtenido se guardó en tubos plásticos a -80°C hasta el momento de su procesamiento. En el caso del núcleo reticular, se juntaron en un mismo tubo los fragmentos de tejido de dos animales pertenecientes al mismo grupo experimental para poder obtener una cantidad de proteínas suficiente para el análisis.

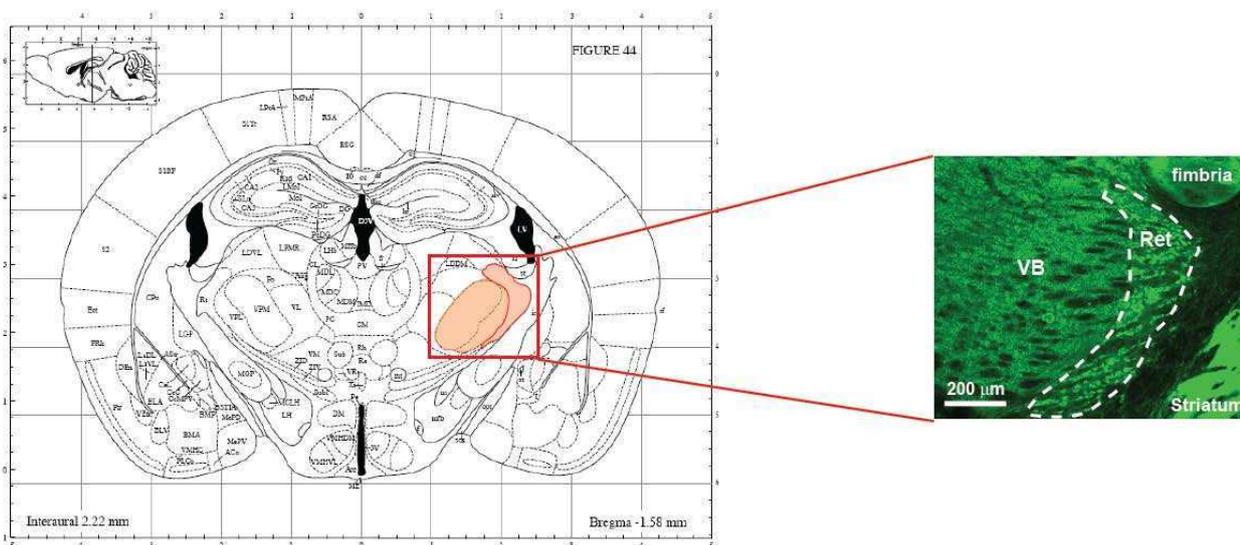


Figura 8. Esquema utilizado para realizar la disección manual de los núcleos Ventrobasal (naranja) y Reticular (rojo) del tálamo. Típicamente de un mismo cerebro se obtuvieron tres rodajas útiles para realizar una disección fiable. La imagen de la derecha corresponde a una fotografía confocal tras la inmunomarcación con un anticuerpo frente a GAD65/67 (Rabbit anti-GAD67/65; 1:10000, Chemicon, EEUU) de los núcleos talámicos VB y Reticular (línea punteada). La imagen de la izquierda está modificada de Paxinos y Franklin, 2001.

La homogeneización de las muestras se realizó en buffer de radioinmunoprecipitación (RIPA; composición: 50mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 1% v/v NP-40, 0,1% p/v SDS, 0,5% p/v deoxicolato de sodio) suplementado con inhibidores de proteasas (10 μ M EDTA, 2mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinina, 100 μ M leupeptina, 1 μ g/ml pepstatina) por disrupción mecánica con un émbolo plástico. Los homogenatos se

incubaron a 4°C en un rotor durante 2 horas y luego se centrifugaron a 4°C durante 20 minutos a 21500g. Se recuperaron los sobrenadantes y se realizó la cuantificación de proteínas con un kit basado en ácido bicinónico (Pierce, EEUU). Las muestras se dividieron en alícuotas de 40µg de proteínas cada una y se guardaron a -80°C hasta el momento de la corrida electroforética.

11.2. Electroforesis en gel de una dimensión y western blot

Las muestras se incubaron con buffer Laemmli (62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2% p/v SDS, 0,01% p/v azul de bromofenol, 2% v/v β-mercaptoetanol, 10% v/v glicerol; Laemmli, 1970) por 3 minutos a 100°C, tras lo que se enfriaron rápidamente en hielo y se sembraron en geles de poliacrilamida 10% desnaturalizantes. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 120V y luego las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Sigma-Aldrich, EEUU) a una corriente constante de 250mA por 2 horas. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con buffer comercial (Thermo Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante y luego las membranas se cortaron de acuerdo a los pesos moleculares de las proteínas de interés en base a un marcador de pesos moleculares coloreado (Fermentas Page Ruler, ThermoScientific Pierce, EEUU) que se corrió junto con las muestras. Las membranas posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con agitación constante con los siguientes anticuerpos primarios, todos hechos en conejo: anti-GAD67/65 (dilución 1:10000, Chemicon, EEUU), anti-actina (1:100, Sigma-Aldrich), anti-Cav3.3 y anti-Cav3.1 (ambos 1:200, Chemicon). Luego, las membranas se lavaron a temperatura ambiente y en agitación con TBST (10mM Tris, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 8) y con TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, pH 8), para proseguir con la incubación con anticuerpo secundario (en todos los casos, anti-IgG conejo acoplado a HRP, dilución 1:1000, Dako, Dinamarca) durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Finalizada la incubación, las membranas se lavaron con TBST y TBS y se procedió al revelado por quimioluminiscencia con ECL comercial (Immobilon Western, EMD Millipore Co., EEUU). La visualización se llevó a cabo con una cámara CCD (LAS-1000, Fujifilm, Japón) y la intensidad de la señal se cuantificó con el programa ImageJ 1.43m (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>, NIH). Las bandas correspondientes a GAD

65, GAD67, Cav3.3 y Cav3.1 se normalizaron a actina (control de carga), y todos los datos se relativizaron luego al promedio del grupo control.

12. Análisis estadístico

El programa utilizado para los análisis estadísticos fue InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Dependiendo del número de grupos en estudio se utilizó el test *t* de Student o el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de comparaciones múltiples por Tukey-Kramer. En el caso de incumplimiento de los supuestos de normalidad u homogeneidad de varianzas, se utilizaron los tests no paramétricos de Wilcoxon-Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron significativas con $p < 0,05$. Todos los datos se muestran como promedio \pm error estándar de la media.

13. Drogas

La Dra. Bisagno ha sido autorizada por la A.N.M.A.T (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Ministerio de Salud de la Nación, Certificado 7561) para trabajar en modelos animales de drogadicción. Asimismo, la ANMAT también ha autorizado el uso de drogas de abuso para protocolos de investigación básica en el IFIBYNE en el marco de una colaboración ININFA-IFIBYNE. El clorhidrato de cocaína fue adquirido de Sigma-Aldrich, y el clorhidrato de metilfenidato (Mallinckrodt Inc., EEUU) fue generosamente donado por Osmotica Pharmaceutical Argentina S.A. (Buenos Aires, Argentina). Los bloqueantes DL-AP5, CNQX, TTX, bicuculina, mibefradil, ZD7288 y QX-314, así como 5-HT y su farmacología específica de antagonistas/agonistas fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Activación locomotora mediada por la administración *in vivo* de *binge* de cocaína y metilfenidato.

1.1. Esquema de tratamientos.

Los animales fueron tratados *in vivo* con un *binge* de cocaína o de metilfenidato (MPH) y sacrificados 1h luego de la última inyección, o con un *binge* por día durante 3 días seguidos y sacrificados 1 ó 24h después de la última inyección (Tabla 2). Los animales control recibieron inyecciones de solución fisiológica igualmente espaciadas.

Tabla 2: Protocolos de administración de cocaína y metilfenidato.

Protocolo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Agudo	Binge/Sacrificar			
Sub-crónicos	Binge	Binge	Binge/Sacrificar	
	Binge	Binge	Binge	Sacrificar
	Binge	Binge	Binge	Binge/Sacrificar

1.2. Registros conductuales

Los psicoestimulantes pueden provocar un aumento de la actividad locomotora, lo que está ligado a circuitos motores de los cuales participan el sistema ThCo motor y el núcleo Reticular del tálamo (Albin y cols., 1989; Gerfen y cols., 1990; Pinault, 2004; Govindaiah y cols., 2010). A fin de validar las dosis de psicoestimulantes utilizadas se realizó un experimento de conducta en el que se registró la actividad locomotora de ratones provocada por un *binge* (tratamiento agudo) y luego de recibir un *binge* por día durante tres días (tratamiento sub-crónico), ya sea de cocaína (15mg/kg por inyección), MPH (15mg/kg por inyección) o solución salina (10µl por gramo de peso del animal). Para ello se utilizó el sistema de adquisición EthoVision (Noldus) en una sala especialmente acondicionada para experimentos de conducta.

Se registró la actividad locomotora durante todo el protocolo de inyecciones de cada día, desde los 30 minutos previos a comenzar el *binge* hasta 45 minutos luego de administrar la última inyección. Veinticuatro horas luego de finalizar las inyecciones se registró la actividad locomotora nuevamente por un período de 30 minutos. En la figura 9 se muestran los valores de actividad locomotora total para los tres tratamientos y trayectorias representativas de distintos momentos del protocolo.

Estos resultados muestran que tanto con un *binge* de cocaína como con un *binge* de MPH se producen aumentos significativos de la actividad locomotora, aunque no se observan diferencias entre ellos (Kruskal-Wallis ANOVA, $H=11,08$, $p<0,05$; cocaína vs. salina: $p<0,001$; MPH vs. salina: $p<0,05$; cocaína vs. MPH: $p>0,05$).

Cuando se prolonga el protocolo de administración a tres días con un *binge* diario, se ve que el efecto de cocaína se potencia con la administración repetida de la droga (esto es, induce un proceso de sensibilización), mientras que los niveles de activación locomotora inducidos por MPH se mantienen estables (ANOVA, $F_{(2,25)}=17,88$, $p<0,0001$; prueba LSD Fisher: todos los tratamientos difieren entre sí con $p<0,01$), lo que podría sugerir que los efectos de cocaína en el sistema ThCo dados por una administración aguda son diferentes a los provocados por la administración sub-crónica (diferencia de actividad entre días 3 y 1: salina: $1690,62 \pm 2149,19$; cocaína: $7914,82 \pm 1519,71$; MPH: $630,05 \pm 1754,81$. ANOVA, $F_{(2,24)}=5,73$, $p<0,01$; prueba LSD Fisher: $p<0,05$, cocaína vs. salina, MPH). Al medir distancia recorrida 24h luego de la última inyección, no se detectaron diferencias entre los tratamientos, lo que sugiere que no existen efectos residuales de cocaína o MPH. Dicho resultado es consistente con la bibliografía ya que tras una hora de haber sido inyectada, la cocaína no se detecta en sangre (Kump y cols., 1994) y de forma similar, la vida media de MPH es de aproximadamente una hora (Manjanatha y cols., 2008).

Otros autores han asociado las diferencias observadas en la actividad locomotora inducida por los *binges* de cocaína y MPH con los mayores tiempos al pico de concentración en el cerebro de estos psicoestimulantes (Logan y cols., 1990; Volkow y cols., 1998). Sin embargo, la diferencia en la activación locomotora inducida por cocaína respecto de la provocada por MPH en el protocolo sub-crónico de administración podría estar mediada por la ausencia de activación serotoninérgica del MPH (lo cual ha sido

evidenciado previamente durante protocolos de mayor duración como el usado aquí; Kuczenski y Segal, 1997; Segal y Kuczenski, 1999).

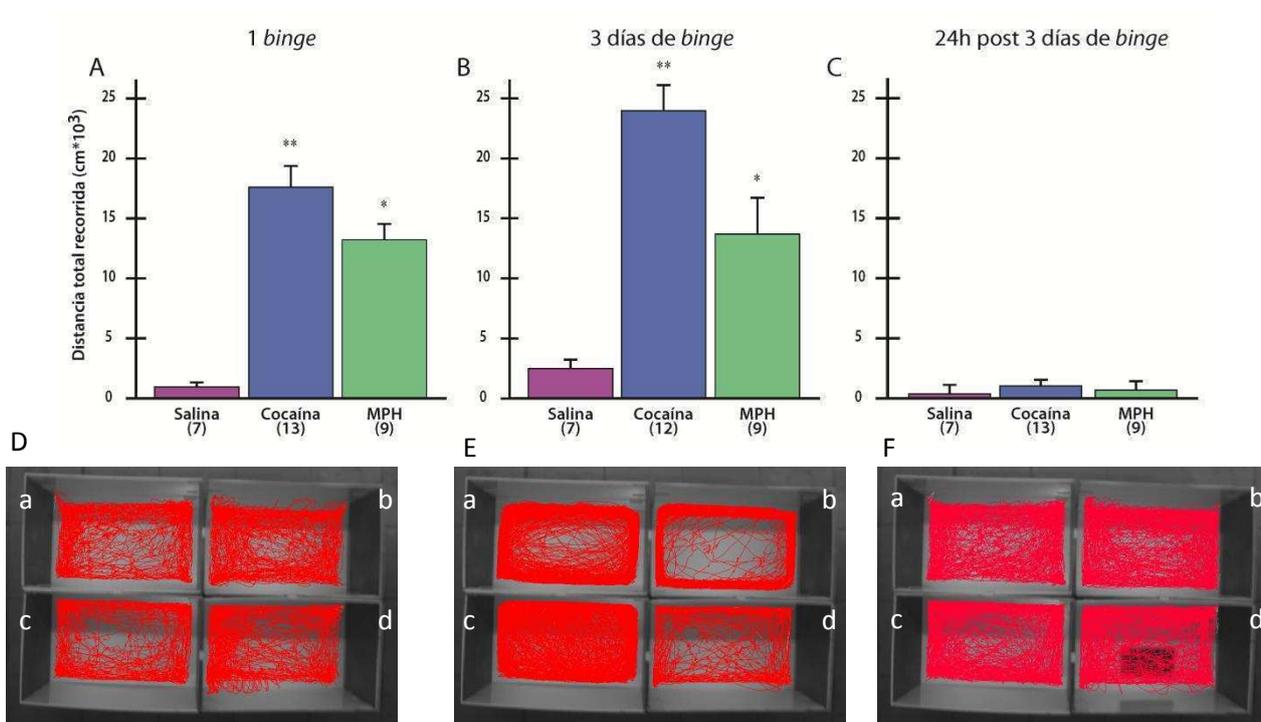


Figura 9. Efectos de la administración aguda y sub-crónica *in vivo* de cocaína o MPH en la actividad locomotora. (A) Distancia total recorrida por ratones inyectados con solución salina, cocaína o MPH durante un *binge* (agudo; ** $p < 0,001$ para cocaína vs. salino; * $p < 0,05$ para MPH vs. salino), (B) durante el tercer *binge* recibido (sub-crónico; ** $p < 0,001$ para cocaína vs. salino; * $p < 0,05$ para MPH vs. salino), (C) y 24h luego de recibir la última inyección del tercer *binge*. Los números entre paréntesis indican el número de ratones incluidos en cada grupo. D-F, trayectorias representativas de ratones tratados con (a) MPH, (b y d) solución fisiológica o (c) cocaína (D) antes de ser sometidos al régimen de inyecciones, (E) tras la segunda inyección del tercer día de tratamiento (F) y 24h luego de recibir la última inyección del tercer *binge*.

2. Registros electrofisiológicos de *patch-clamp*

2.1 Efectos de la administración in vivo de cocaína y metilfenidato sobre la transmisión GABAérgica talámica espontánea y sobre los canales de calcio en neuronas del núcleo Ventrobasal talámico

Estudios previos de nuestro grupo han descrito que un *binge* de cocaína en el núcleo Ventrobasal (VB) del tálamo produce una mayor actividad GABAérgica que ha sido correlacionada con el aumento en la actividad locomotora (Bisagno y cols., 2010) y con el aumento en la proporción de bajas frecuencias en los registros de EEG en el animal entero (Urbano y cols., 2009). También se ha visto que el bloqueo de los canales de calcio de tipo T, tanto *in vivo* como *in vitro*, previene tanto la activación locomotora como el aumento en la liberación de GABA por las terminales del núcleo reticular talámico (Bisagno y cols., 2010), por lo que se propone que los niveles de activación de los canales de calcio tipo T y la modulación presináptica a nivel de la liberación de GABA son sustratos clave de la acción de psicoestimulantes como cocaína, y quizás MPH, en el sistema ThCo.

En primera instancia se evaluó la liberación espontánea de GABA mediante el registro de corrientes miniatura GABAérgicas en neuronas del núcleo VB (Figura 10), en presencia de los bloqueantes glutamatérgicos CNQX y DL-AP5 y del bloqueante de canales de Na⁺ sensibles a voltaje TTX. El tratamiento con un *binge* de cocaína *in vivo* indujo un aumento en la frecuencia de minis que no se observó con MPH (Kruskal-Wallis ANOVA, cocaína vs. MPH: $H=6.85$, $p<0,01$; cocaína vs. salina: $H=15,75$, $p<0,05$; cocaína vs. MPH, $p>0,05$). Sin embargo, si el tratamiento se extiende a tres días de *binge*, ambos psicoestimulantes generan un aumento similar de la frecuencia de liberación espontánea de GABA (Kruskal-Wallis ANOVA, $H=9,9$, $p<0,01$), efecto que no se observa al sacrificar los animales 24h después de la última inyección del protocolo sub-crónico (Figura 10).

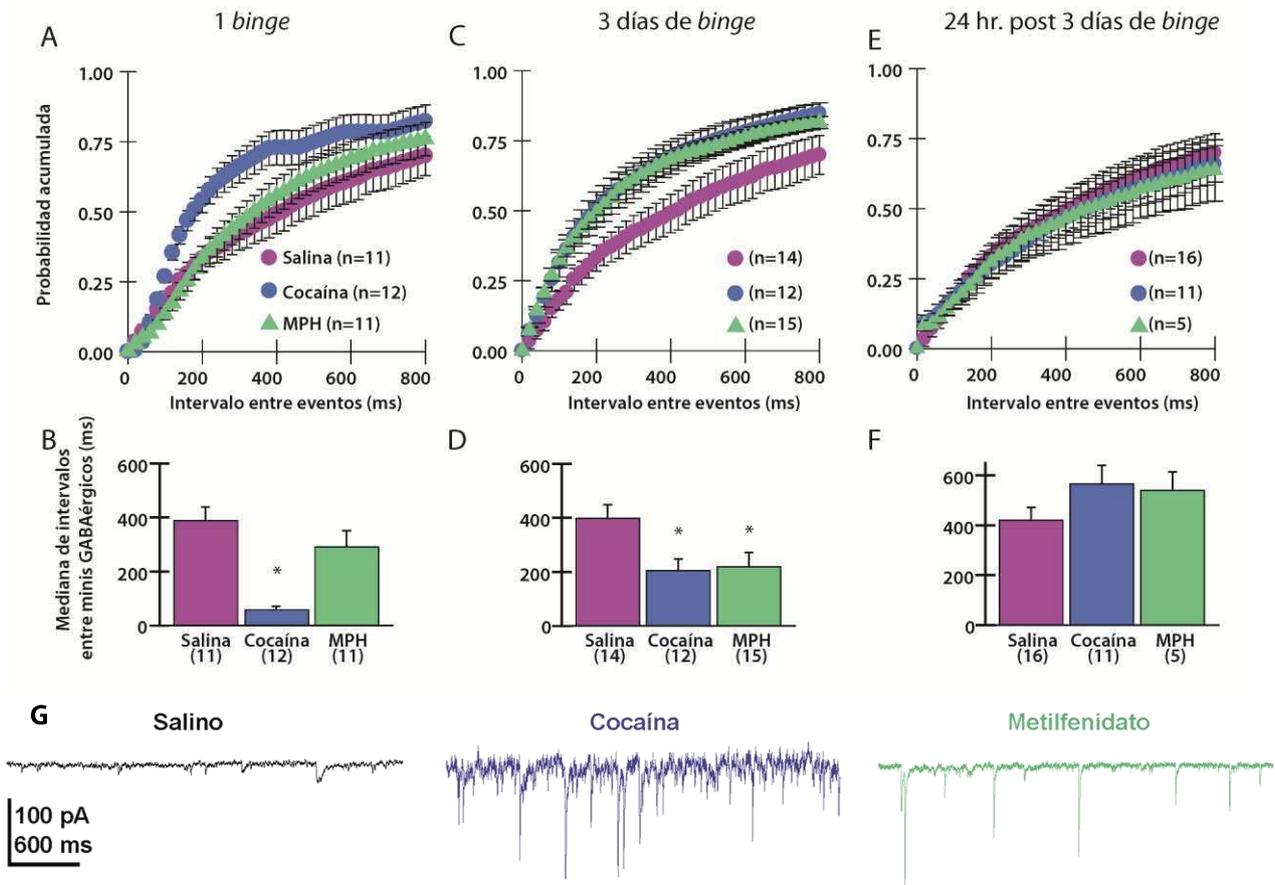


Figura 10. Efectos de la administración aguda y sub-crónica de cocaína o MPH en la liberación espontánea de GABA sobre el núcleo VB. (A, C, E) Gráficos de probabilidad acumulada para los intervalos entre corrientes miniatura GABAérgicas (media \pm error estándar de la media) registradas en neuronas ventrobasales de animales tratados con solución salina (magenta), cocaína (azul) o MPH (verde) y sacrificados (A) 1h luego de recibir la última inyección de un *binge*, (C) una hora luego de recibir la última inyección del tercer *binge* (sub-crónico) o (E) 24h luego de la última inyección del tercer *binge*. (B, D, F) Medianas de los intervalos entre corrientes miniatura GABAérgicas para los animales tratados con solución fisiológica, cocaína o MPH y sacrificados (B) 1h luego de recibir la última inyección de un *binge*, (D) una hora luego de recibir la última inyección del tercer *binge* o (F) 24h luego de la última inyección del tercer *binge*. Los valores de las medianas se obtuvieron tras ajustar los datos de probabilidad acumulada a la siguiente función de crecimiento exponencial: $y = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot \text{Tiempo (ms)})$. (G) Registros representativos de corrientes miniatura GABAérgicas para los animales tratados con solución salina, cocaína y MPH, sacrificados 1h luego de recibir la última inyección de un *binge*. * $p < 0,05$. Los números entre paréntesis indican el número de neuronas registradas en cada grupo.

Dados los resultados previos del grupo de investigación, que indicaron un rol de los canales de calcio tipo T en la disritmia ThCo inducida por cocaína *in vivo* (Bisagno y cols., 2010; Urbano y cols., 2009), se estudió si los tratamientos empleados afectan la densidad de corriente a través de estos canales en relación a los tipo P/Q utilizando rampas de voltaje que permiten activar primero los canales T (de bajo umbral de activación, *low voltage activated*, LVA) y luego los P/Q (de alto umbral de activación, *high voltage activated*, HVA). Si bien se observó un incremento en el cociente LVA/HVA para un *binge* de cocaína, este efecto no se observó con el protocolo de administración sub-crónico (Figura 11). En los registros obtenidos de animales sacrificados 24h después de la última inyección del tratamiento sub-crónico con cocaína el cociente es significativamente menor al del tratamiento control y al de MPH, aunque esto se debe a una mayor corriente a través de los canales P/Q (no se observaron alteraciones en la corriente a través de canales tipo T, sino que la densidad de corriente mediada por los canales P/Q aumentó un $253 \pm 18\%$, lo que redujo significativamente el cociente de amplitudes; Kruskal-Wallis ANOVA; $H=13,9$, $p<0,01$, $n = 10$).

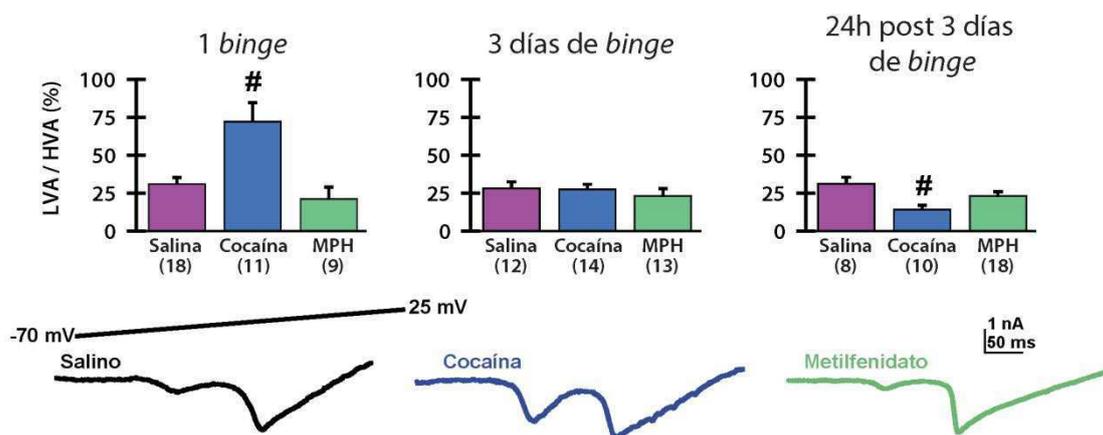


Figura 11. Efectos de la administración aguda y sub-crónica de cocaína o MPH en el cociente LVA/HVA. Se muestran registros representativos de neuronas obtenidas de animales tratados con solución salina, cocaína y MPH, sacrificados 1h luego de recibir la última inyección de un *binge*. # $p<0,01$, cocaína vs. MPH, salino. Los números entre paréntesis indican el número de neuronas registradas en cada grupo.

2.2. Efectos de la administración in vivo de cocaína y metilfenidato sobre la transmisión GABAérgica evocada sobre el núcleo Ventrobasal talámico.

A continuación se estudió el efecto de los dos psicoestimulantes utilizados sobre la liberación evocada de GABA mediante la estimulación de las fibras del núcleo reticular y el registro de las corrientes mediadas por receptores GABA-A en neuronas Ventrobasales. Los axones eferentes del núcleo reticular se estimularon con pulsos pareados a 10Hz o a 40Hz mediante un electrodo concéntrico y se midieron las corrientes evocadas en neuronas del núcleo VB en presencia de bloqueantes de receptores glutamatérgicos (DL-AP5 y CNQX). La amplitud de la corriente en respuesta al segundo estímulo se relativizó a la amplitud de corriente en respuesta al primero (PPR, *paired-pulse ratio*; Figura 12). Este cociente permite analizar si la sinapsis en estudio presenta depresión o facilitación (ver Metodología).

A pesar de que el tratamiento agudo con MPH resultó en un aumento en los valores de PPR cuando se estimuló a alta frecuencia, los PPR siempre se mantuvieron por debajo de la unidad, lo que indica depresión de la transmisión sináptica GABAérgica (Figura 12). El agregado de mibefradil (20 μ M), bloqueante de los canales de calcio tipo T, no afectó los resultados obtenidos con un *binge* de cocaína, MPH o solución fisiológica, por lo que se puede decir que los canales de tipo T no están involucrados en fenómenos de facilitación/depresión sináptica evocada por estimulación. Al extender el tratamiento a tres días y sacrificar los animales 1h luego de la última inyección, se observó que MPH indujo un aumento en los valores de PPR también para la frecuencia de estimulación baja; en cambio, cuando se sacrificaron los animales al día siguiente se vio que el tratamiento con cocaína llevó los valores de PPR a superar la unidad en alta frecuencia, lo que indica facilitación de la transmisión sináptica GABAérgica.

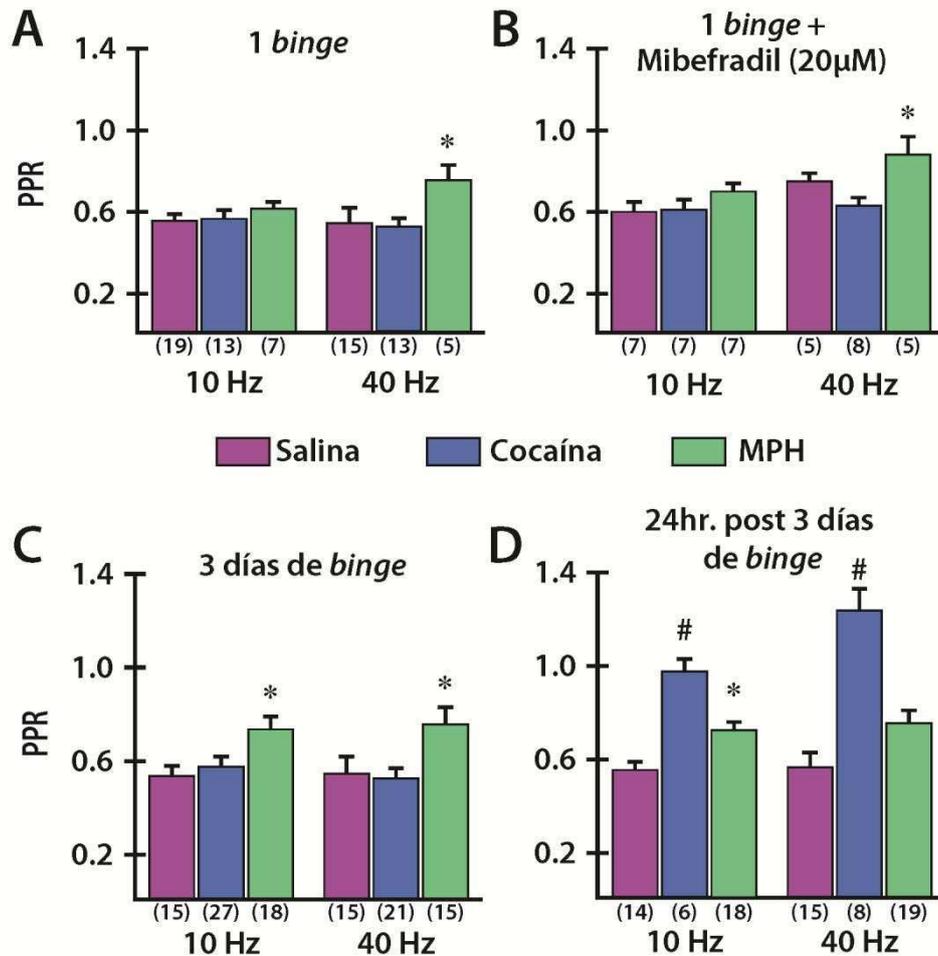


Figura 12. Efectos de la administración aguda y sub-crónica de cocaína o MPH en el cociente de pulsos pareados (PPR). La amplitud de la corriente en respuesta al segundo estímulo se relativizó a la corriente debida por el primero. Se obtuvieron registros en neuronas ventrosales de animales (A) tratados con el protocolo agudo, en ausencia o (B) en presencia de mibefradil (bloqueante de canales T) o (C) tratados con el protocolo sub-crónico de tres días y sacrificados a 1h o (D) a 24h de la última inyección. * $p < 0,05$, MPH versus salino y cocaína. # $p < 0,01$, cocaína versus salino. Los números entre paréntesis indican el número de neuronas registradas en cada grupo.

Tal como se ha descrito para frecuencias de estimulación similares (Zhang y cols., 2010), los valores de PPR a 10Hz no difirieron de los de PPR a 40Hz para los animales control, lo que indica una independencia de los PPR frente a este rango de frecuencias de estimulación. Con respecto a las diferencias observadas entre los tratamientos de

cocaína y MPH, los resultados sugieren un mecanismo complejo, ya que se sabe que las monoaminas modulan la liberación de GABA desde el núcleo reticular del tálamo. Se sabe que la activación de receptores D4 genera un aumento en los valores de PPR a 10Hz cuando se estimulan los aferentes del globus pallidus, aunque no se ve alterada la transmisión GABAérgica intra-reticular (Govindaiah y cols., 2010). Sin embargo, las consecuencias del aumento de los niveles de DA en el núcleo VB (Rutter y cols., 1998) y las terminales GABAérgicas procedentes del núcleo reticular se han empezado a describir recientemente (Erlj y cols., 2012), aunque es difícil extrapolarlos a nuestras condiciones experimentales.

Los valores de PPR tras la administración sub-crónica *in vivo* de MPH se vieron afectados tanto con la estimulación a 10Hz como a 40Hz, lo que sugiere una modulación similar de las neuronas reticulares a ambas frecuencias, tal como se ha descrito *in vivo* (Pinault y Deschênes, 1992). Por otro lado, el MPH podría estar mediando una inhibición presináptica de la liberación de GABA (Federici y cols., 2005), mientras que el tratamiento con cocaína podría estar provocando una compensación homeostática (ver apartado siguiente) sobre la inhibición de la liberación de GABA mediante el bloqueo de la inhibición GABAérgica intra-reticular, lo que llevaría a un aumento en la frecuencia de liberación de GABA sobre el núcleo VB. Podría esperarse que las corrientes de calcio a través de canales de tipo T jueguen un rol en la inhibición intra-reticular: si se produce una reducción de los potenciales de bajo umbral mediados por las corrientes T a nivel de los somas de las neuronas reticulares (Crandall y cols., 2010; Sun y cols., 2012), se espera una disminución en la liberación de GABA intra-reticular, y una menor inhibición de las neuronas reticulares llevaría a una mayor liberación de GABA sobre las neuronas del núcleo VB. Además, la sobreactivación de los canales de calcio tipo T a nivel del núcleo reticular del tálamo se vincula con conductas patofisiológicas como la epilepsia (Steriade y Llinás, 1988; Tsakiridou y cols., 1995), un desorden neurológico asociado con la administración crónica de cocaína pero no de MPH (Devlin y Henry, 2008). A su vez, la sobreactivación de la transmisión GABAérgica del núcleo reticular alteraría la transmisión de estímulos sensoriales a través de las neuronas de relevo talámicas, mecanismo que se cree subyace las anomalías observadas en los EEG de pacientes diagnosticados con ADHD (Rowe y cols., 2005). Los resultados aquí presentados

sugieren que MPH puede alterar el procesamiento ThCo, aunque de una manera mucho más sutil que cocaína.

Si bien la estimulación por pulsos pareados permite evaluar la probabilidad de liberación de GABA, no refleja la forma de funcionamiento fisiológico a largo plazo del sistema ThCo, por lo que se procedió a analizar si los tratamientos con cocaína *in vivo*, tanto de un único *binge* como de 3 ó 4 días consecutivos de *binge*, tienen efecto alguno sobre patrones de liberación de GABA similares a los que ocurren en el cerebro del animal vivo. Dado que en ratón ni las neuronas de relevo talámicas ni las del núcleo reticular disparan potenciales de acción por sí mismas una vez obtenidas las rodajas, mediante un electrodo concéntrico se estimularon los axones eferentes del núcleo reticular con trenes de diez pulsos a 10Hz ó 40Hz y se midieron las corrientes evocadas en neuronas del núcleo VB en presencia de DL-AP5 y CNQX (Figura 13). Las neuronas Ventrobasales de las que se obtuvieron los registros provinieron de ratones tratados con un *binge* de solución fisiológica o de cocaína (tratamiento agudo), o con un *binge* por día de cocaína durante tres o cuatro días consecutivos (tratamientos sub-crónicos).

Al analizar la carga durante los trenes de estimulación, no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos en estudio para ninguna de las dos frecuencias utilizadas (Kruskal-Wallis ANOVA: 10Hz, $H=5,66$, $p=0,1292$; 40Hz, $H=2,74$, $p=0,4339$). En cambio, el análisis de la corriente posterior a la finalización del tren reveló que a 10Hz el grupo que recibió un *binge* de cocaína durante tres días presentó una corriente mayor a la de los demás grupos (Kruskal-Wallis ANOVA: $H=12,04$, $p=0,0073$; comparaciones múltiples: $p<0,05$; CC3d(1h) vs. CC1d, CC4d(1h), SF). A 40Hz no se diferenciaron significativamente los grupos (Kruskal-Wallis ANOVA: $H=2,7$, $p=0,4405$).

Este resultado podría reflejar un aumento en la liberación asincrónica de GABA cuando el sistema ThCo trabaja a frecuencias propias del estadio “dormido” y apoya la hipótesis de que la cocaína fomenta un estado de disritmia ThCo a través de una exacerbación de la inhibición que ejerce el núcleo reticular sobre los demás núcleos talámicos.

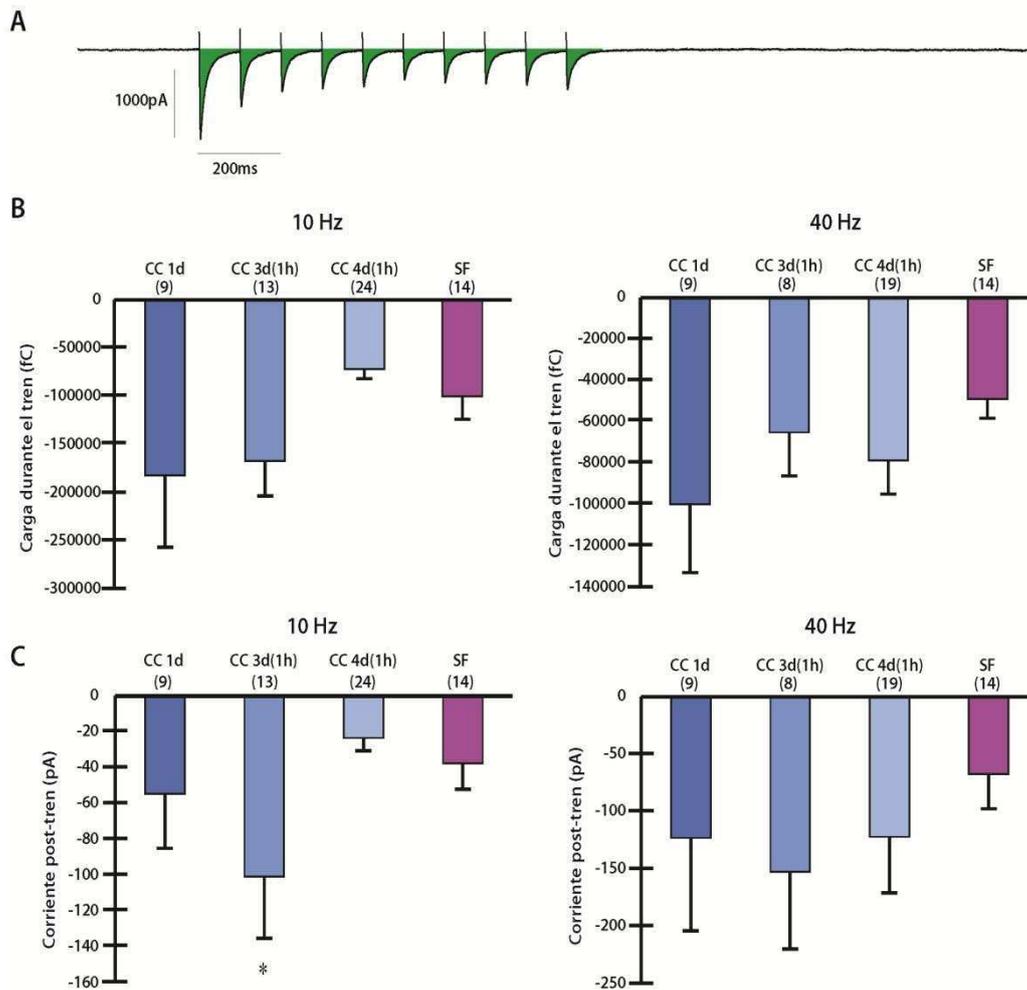


Figura 13. Efecto de la administración aguda y subcrónica de cocaína sobre las corrientes inhibitorias evocadas en neuronas Ventrobasaes al estimular el núcleo reticular con trenes de pulsos a 10 Hz y a 40 Hz. (A) Trazo representativo de la respuesta a un tren de estimulación (10Hz) de una neurona control (un *binge* de solución fisiológica). En verde se muestra el área bajo la curva, correspondiente a la medición de carga. (B) Carga entrante durante el tren para los cuatro grupos experimentales (un *binge* de cocaína, CC1d; tres días de *binge* de cocaína, CC3d(1h); cuatro días de *binge* de cocaína, CC4d(1h); un *binge* de solución fisiológica, SF). (C) Corriente medida luego de finalizado el tren de estimulación para los cuatro grupos experimentales. Los números entre paréntesis indican el número de neuronas incluidas en cada grupo. * $p < 0,05$; CC3d(1h) vs. CC1d, CC4d(1h), SF; Kruskal-Wallis ANOVA.

Las consecuencias funcionales de un aumento en la inhibición de las neuronas Ventrobasales son muy graves, ya que llevaría a una actividad ThCo recurrente de baja frecuencia, en modo de disparo de *bursts* en lugar de disparo tónico, tanto por parte del núcleo reticular (Huguenard y Prince, 1992; Llinás y Geijo-Barrientos, 1988) como del VB (Jahnsen y Llinás, 1984a, 1984b; McCormick y Feeseer, 1990). La coherencia prolongada entre *bursts* de baja frecuencia y disparos tónicos de alta frecuencia a nivel ThCo en un individuo despierto puede alterar la percepción sensorial (McCormick y Feeseer, 1990) y la nocicepción (Liao y cols., 2011), en concordancia con el síndrome de disritmia ThCo (Jeanmonod y cols., 2003; Llinás y cols., 1999).

2.3. Efectos de la aplicación de cocaína y metilfenidato in vitro sobre el núcleo reticular talámico.

Frente a la modulación descrita en esta tesis del sistema ThCo por parte de la cocaína, y en menor medida del MPH, es esperable que las neuronas reticulares deban recuperarse de las alteraciones sufridas sobre sus conductancias iónicas y la transmisión GABAérgica (Federici y cols., 2005; Shoji y cols., 1998): durante la administración de cocaína o MPH podrían producirse fenómenos de bloqueo o modulación de canales (por ejemplo, canales de calcio tipo T) y receptores de membrana (receptores de GABA-A) que podrían desencadenar un **fenómeno homeostático compensatorio** (del inglés, *homeostatic compensation*, Baines, 2003) tras el lavado de dichos estimulantes del sistema ThCo. Los cambios homeostáticos neuronales han sido descritos en diferentes especies, y consisten en cambios moleculares a niveles traduccionales y post-traduccionales que son capaces de compensar los cambios rápidos de excitabilidad neuronal dentro de su propio circuito (Baines, 2003; Driscoll y cols., 2013).

En este sentido, los cambios drásticos inducidos por la cocaína en la transmisión GABAérgica y en las propiedades intrínsecas de las neuronas talámicas podrían deberse

a un bloqueo de la actividad neuronal del núcleo reticular que sería compensado homeostáticamente por el circuito mediante un aumento marcado de la transmisión sináptica GABAérgica. Probamos esta hipótesis aplicando MPH 10 μ M sobre rodajas tálamo-corticales obtenidas de animales *naïve* y observamos que no afectó la frecuencia de disparo de potenciales de acción en neuronas reticulares, mientras que la aplicación de cocaína 10 μ M genera una reducción de esta misma variable (Figura 14).

Estos resultados sugieren un novedoso mecanismo homeostático que nos ayudaría a entender los efectos de cocaína en el sistema ThCo. Probablemente el tratamiento sub-crónico con cocaína esté bloqueando la actividad intra-somática de las neuronas reticulares, requerida para una correcta comunicación intra-reticular (Sun y cols., 2012), lo que podría explicar un aumento en los valores de PPR observados 24h luego de finalizado el tratamiento sub-crónico, tras la metabolización y extrusión de la cocaína del cerebro. Esta hipótesis fue parcialmente demostrada previamente por nuestro grupo (Urbano y cols., 2009), ya que se observó que 24 horas después de un *binge* de cocaína la frecuencia de minis de GABA registrada en neuronas del VB sigue siendo mayor al observado en los controles (salinos). Los efectos de MPH sobre las propiedades intrínsecas de las neuronas reticulares serían mucho más sutiles, lo que acompaña el efecto modesto pero sostenido en el tiempo de este estimulante sobre los valores de PPR.

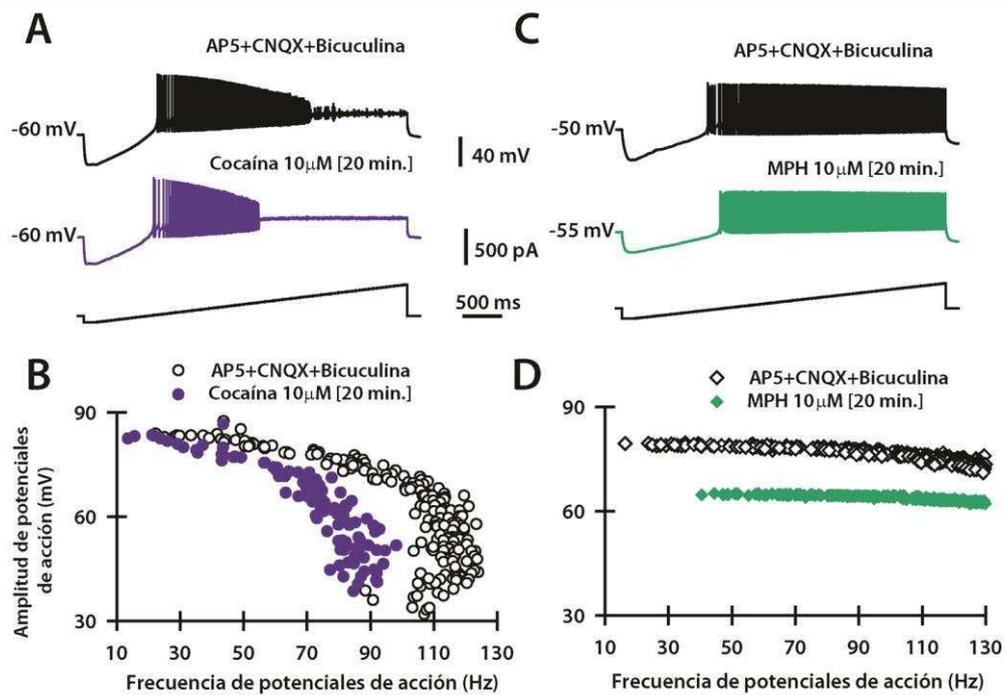


Figura 14. Efectos de la aplicación *in vitro* de cocaína y MPH en el disparo de potenciales de acción de neuronas reticulares. (A) Registros representativos del potencial de membrana de una neurona del núcleo reticular del tálamo frente a la inyección de una rampa de corriente de 5 segundos (en presencia de bicuculina 50µM, DL-AP5 50µM y CNQX 20µM) antes (trazo negro) y 20 minutos después del agregado de cocaína 10µM (trazo violeta). Frente a la inyección de una corriente hiperpolarizante estas neuronas presentan una rectificación del potencial mediada por la corriente I_h , seguida del disparo de potenciales de acción a alta frecuencia durante la despolarización provocada por la rampa de corriente inyectada. (B) Amplitud de los potenciales de acción en función de la frecuencia instantánea para una neurona reticular en condiciones control (círculos blancos) y en presencia de cocaína 10µM (círculos violetas), correspondiente a los registros mostrados en (A); el mismo comportamiento se observó en 8 neuronas. (C) Registros representativos del potencial de membrana de una neurona del núcleo reticular del tálamo frente a la inyección de una rampa de corriente de 5 segundos (en presencia de bicuculina 50µM, DL-AP5 50µM y CNQX 20µM) antes (trazo negro) y 20 minutos después del agregado de MPH 10µM (trazo verde). (D) Amplitud de los potenciales de acción en función de la frecuencia instantánea para una neurona reticular en condiciones control (círculos blancos) y en presencia de MPH 10µM (círculos verdes), correspondiente a los registros mostrados en (C); el mismo comportamiento se observó en 8 neuronas.

3. Efectos de cocaína sobre la expresión de GAD y CCDV tipo T.

Como mencionamos anteriormente, la transmisión serotoninérgica podría estar mediando alguno de los mecanismos de compensación homeostáticos que diferencian los efectos observados de la cocaína con respecto al MPH. Se ha descrito que las monoaminas modulan las propiedades intrínsecas de las neuronas de relevo talámicas. Se ha reportado que la 5-HT puede aumentar *in vitro* la densidad de corriente de calcio mediada por los canales tipo T, mientras que la DA no ejerce este efecto (Berger y Takahashi, 1990; Fraser y MacVicar, 1991). Sin embargo, no existen estudios bioquímicos específicos que hayan descrito cómo cambian, tras la administración *in vivo* de cocaína, los niveles de proteína de los canales de calcio de tipo T y los niveles de GAD (glutamato descarboxilasa, enzima que constituye el paso limitante en la síntesis de GABA) en las sinapsis entre el núcleo Reticular y el núcleo VB, por lo que se procedió a estudiar los niveles de dichas proteínas tras la administración de cocaína según los protocolos de administración *in vivo* descritos en la Tabla 2.

3.1 GAD

Evaluamos la posibilidad de que los cambios homeostáticos mediados por los efectos de la cocaína puedan producir cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la transmisión GABAérgica. En primer lugar se estudiaron por *Western Blotting* los niveles de expresión de la enzima GAD en sus dos isoformas, GAD67 y GAD65, tanto en el núcleo reticular como en el núcleo VB de animales tratados con un *binge* de cocaína (3 inyecciones *i.p.* de 15mg/kg cada una, espaciadas entre sí cada 1h) y sacrificados ya sea 1h (Figura 15) o 24h (Figura 16) después de la última inyección. Los valores obtenidos se relativizaron a actina (proteína tomada como control de carga) para cada muestra y luego al valor promedio de las muestras de animales tratados con solución fisiológica.

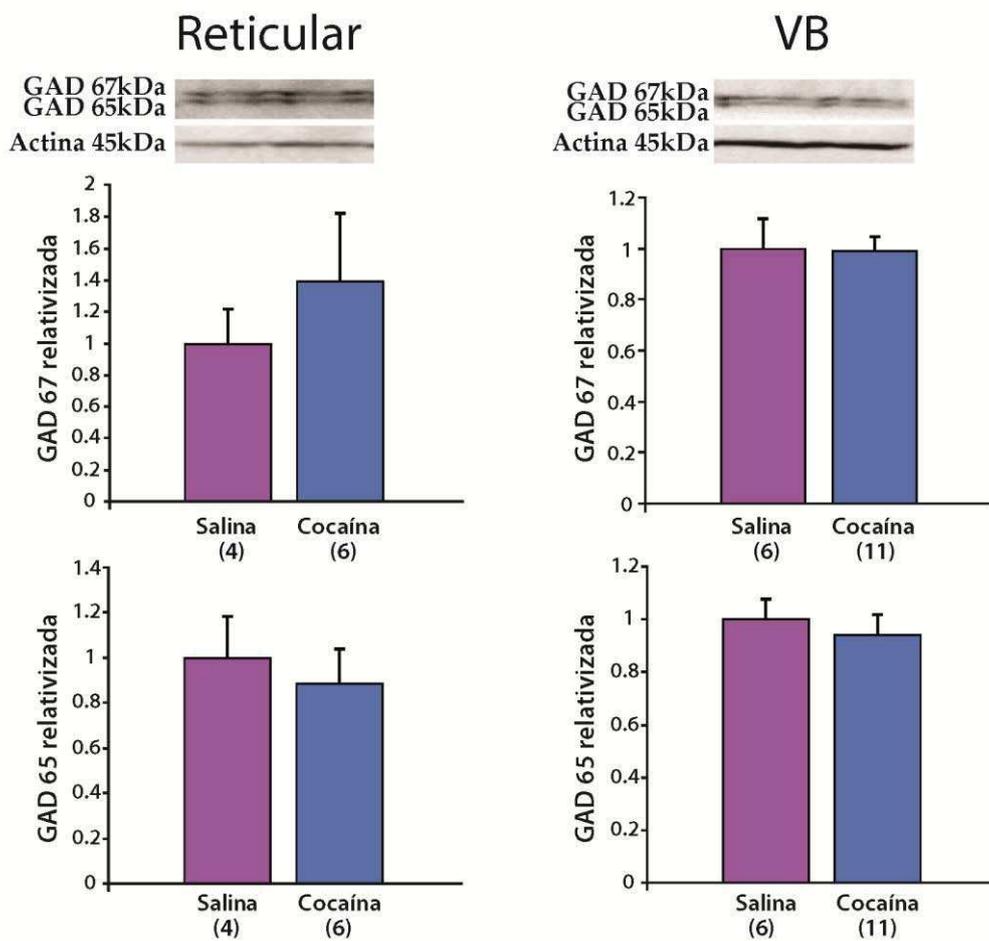


Figura 15. Efectos de la administración aguda de cocaína sobre los niveles de GAD. Niveles de GAD65 y GAD67 medidos por *Western Blot*, obtenidos de los núcleos talámicos reticular y VB, relativizados a actina y al promedio de los valores obtenidos de animales tratados con solución fisiológica (salina). Los animales se sacrificaron luego de una hora de la última inyección. Los valores entre paréntesis indican el número de muestras independientes utilizadas para el análisis (prueba *t* de Student).

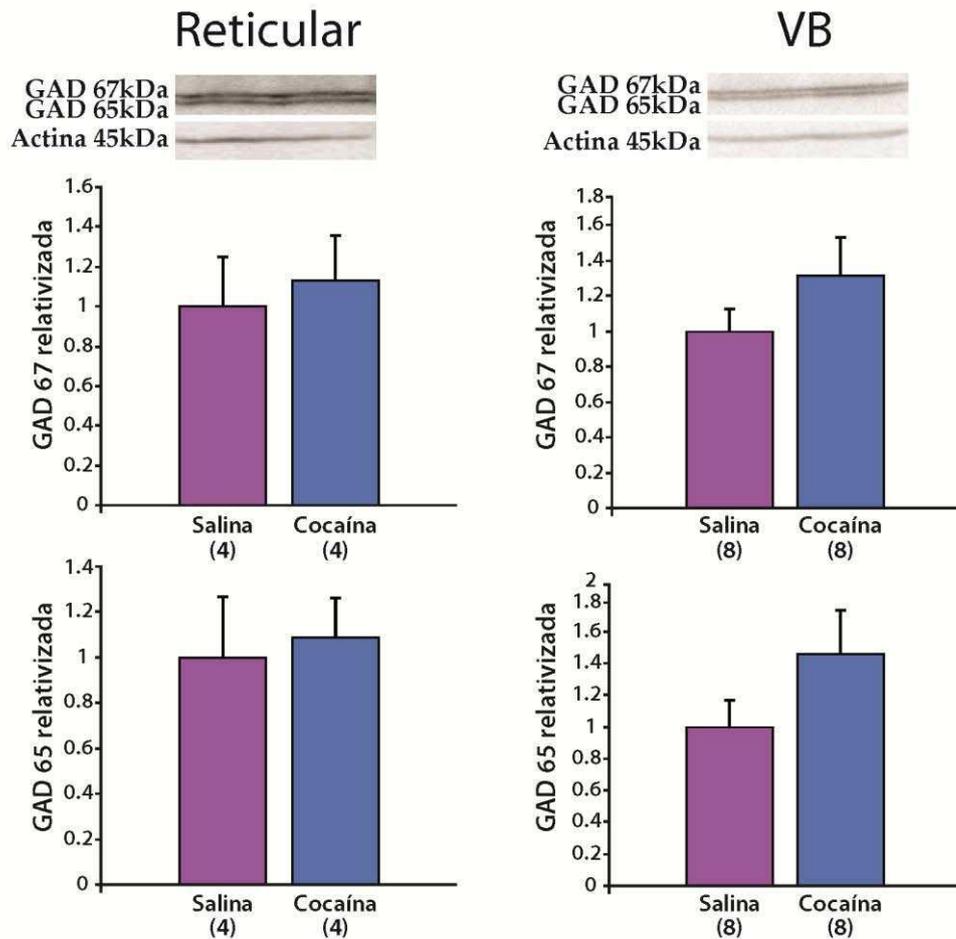


Figura 16. Efectos de la administración aguda de cocaína sobre los niveles de GAD. Niveles de GAD65 y GAD67 medidos por *Western Blot*, obtenidos de los núcleos talámicos reticular y VB, relativizados a actina y al promedio de los valores obtenidos de animales tratados con solución fisiológica (salina). Los animales se sacrificaron a las 24h de la última inyección. Los valores entre paréntesis indican el número de muestras independientes utilizadas para el análisis (prueba *t* de Student).

Al no haber observado diferencias significativas entre ambos grupos se decidió prolongar el protocolo de administración a un tratamiento sub-crónico: durante tres o cuatro días se administró un *binge* de cocaína por día a fin de potenciar los posibles efectos de la droga sobre los niveles de GAD65, GAD67. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 17 a 19.

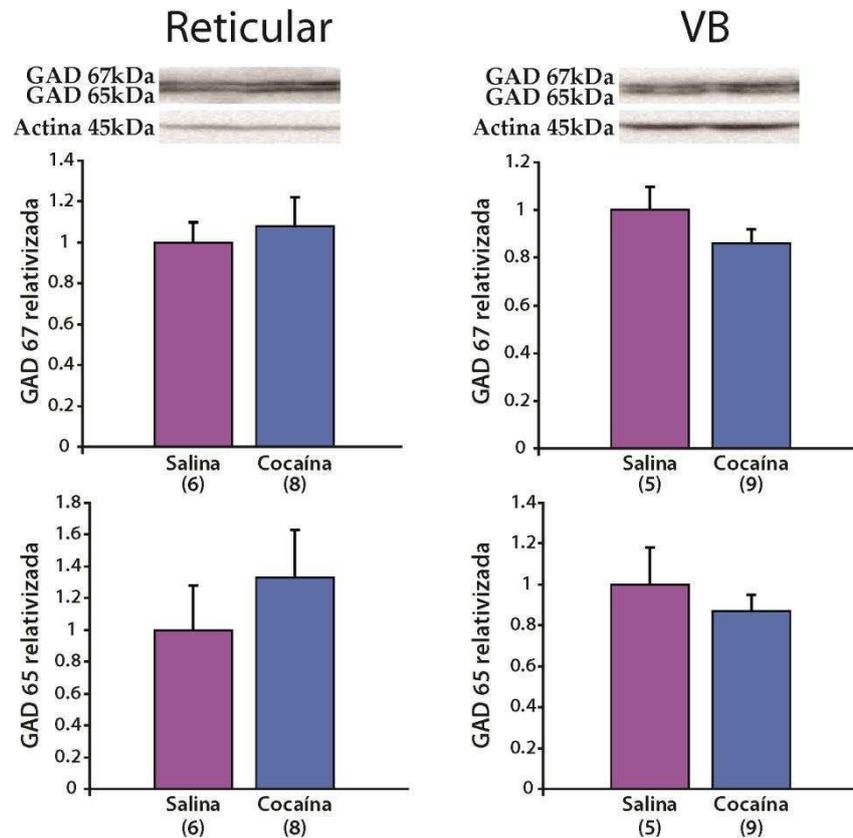


Figura 17. Efectos de la administración sub-crónica (tres días) de cocaína sobre los niveles de GAD. Niveles de GAD65 y GAD67 medidos por *Western Blot*, obtenidos de los núcleos talámicos reticular y VB, relativizados a actina y al promedio de los valores obtenidos de animales tratados con solución fisiológica (salina). Los animales recibieron un *binge* de cocaína por día durante tres días consecutivos y fueron sacrificados 1h luego de la última inyección. Los valores entre paréntesis indican el número de muestras independientes utilizadas para el análisis (prueba *t* de Student).

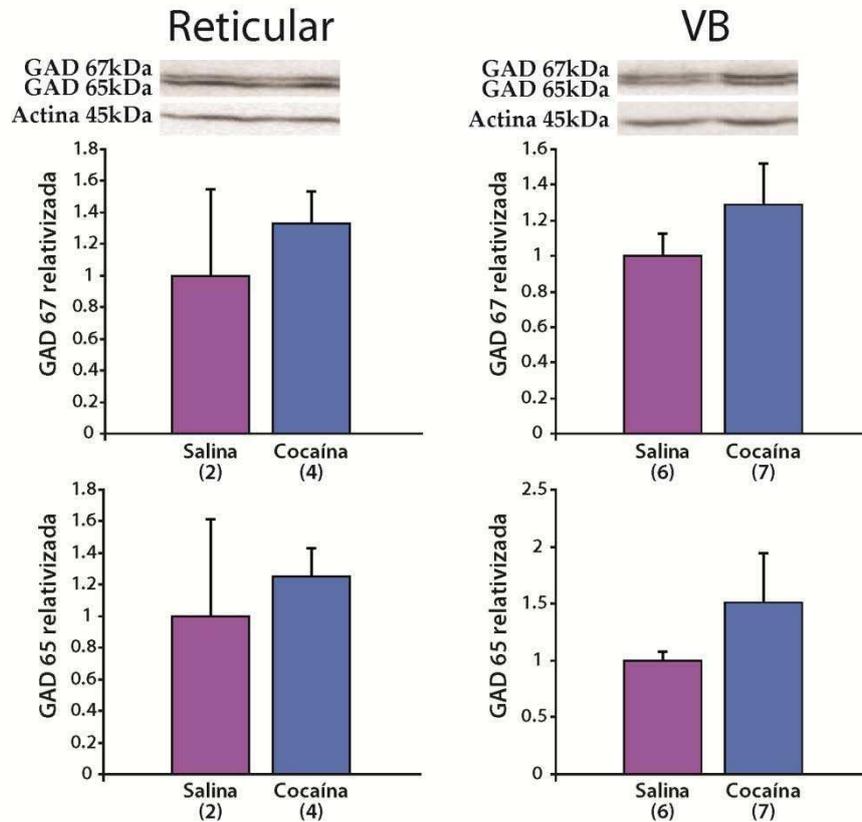


Figura 18. Efectos de la administración sub-crónica (tres días) de cocaína sobre los niveles de GAD. Niveles de GAD65 y GAD67 medidos por *Western Blot*, obtenidos de los núcleos talámicos reticular y VB, relativizados a actina y al promedio de los valores obtenidos de animales tratados con solución fisiológica (salina). Los animales recibieron un *binge* de cocaína por día durante tres días consecutivos y fueron sacrificados 24h luego de la última inyección. Los valores entre paréntesis indican el número de muestras independientes utilizadas para el análisis (prueba *t* de Student).

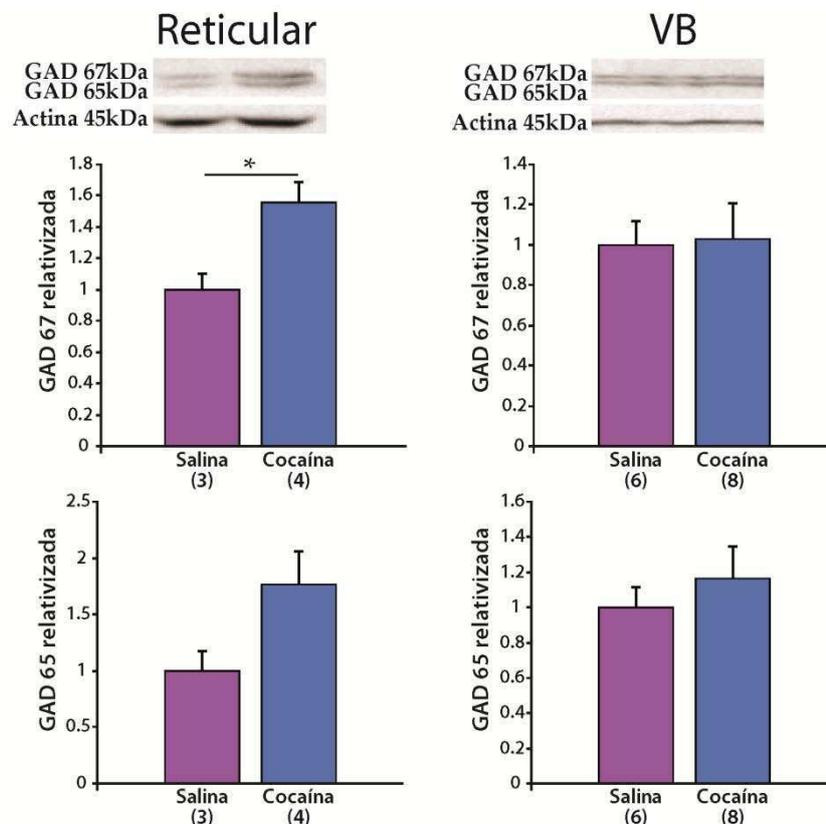


Figura 19. Efectos de la administración sub-crónica (cuatro días) de cocaína sobre los niveles de GAD. Niveles de GAD65 y GAD67 medidos por *Western Blot*, obtenidos de los núcleos talámicos reticular y VB, relativizados a actina y al promedio de los valores obtenidos de animales tratados con solución fisiológica (salina). Los animales recibieron un *binge* de cocaína por día durante cuatro días consecutivos y fueron sacrificados 1h luego de la última inyección. Los valores entre paréntesis indican el número de muestras independientes utilizadas para el análisis (prueba *t* de Student). * $p=0,024$.

De estos resultados se puede concluir que sólo al administrar cocaína por cuatro días consecutivos se aprecia un cambio en los niveles de expresión de GAD67. El aumento observado en esta proteína, que es del 50% (figura 19), ocurrió en los somas de las neuronas reticulares y podría en parte compensar la inhibición mediada por

cocaína, permitiendo el posterior incremento en la transmisión GABAérgica observada previamente por nuestro grupo y ratificada en la presente tesis. El hecho de no haber encontrado un aumento en los niveles de GAD67 tras un único *binge* de cocaína (Figura 15), a pesar de que sí se observó un aumento en la frecuencia de minis GABAérgicos (Figura 10), podría explicarse por la baja sensibilidad de la técnica de *Western Blot* para determinar cambios pequeños en la expresión proteica o por cambios en el nivel de actividad de la enzima, no detectados por esta metodología. Asimismo, también se podría suponer que el aumento de la frecuencia de minis GABAérgicos tras un solo *binge* de cocaína no requiere del aumento en la expresión y/o traducción de proteínas.

3.2. Canales de calcio de tipo T

Los canales de calcio tipo T están involucrados en los transitorios de calcio de las dendritas distales de las neuronas del núcleo reticular, donde permiten la integración de las aferencias GABAérgicas (Crandall y cols., 2010; Sun y cols., 2012). Aunque no se conozca la distribución de Cav3.1, 3.2 y 3.3 en ratón, los datos disponibles de expresión de ARNm de estas subunidades en rata (Talley y cols., 1999) sugieren que las tres se encuentran en el tálamo de roedores.

Si tenemos en cuenta los resultados presentados en las secciones anteriores y el hecho de que el bloqueo de los canales de calcio de tipo T previene el aumento inducido por cocaína en la liberación de GABA desde el núcleo reticular (Bisagno y cols., 2010), es esperable que los tratamientos sub-crónicos con cocaína afecten los niveles de expresión proteica de los canales de calcio de tipo T. Decidimos evaluar esta posibilidad por *Western Blot*, y los resultados obtenidos se resumen en las figuras 20 a 22.

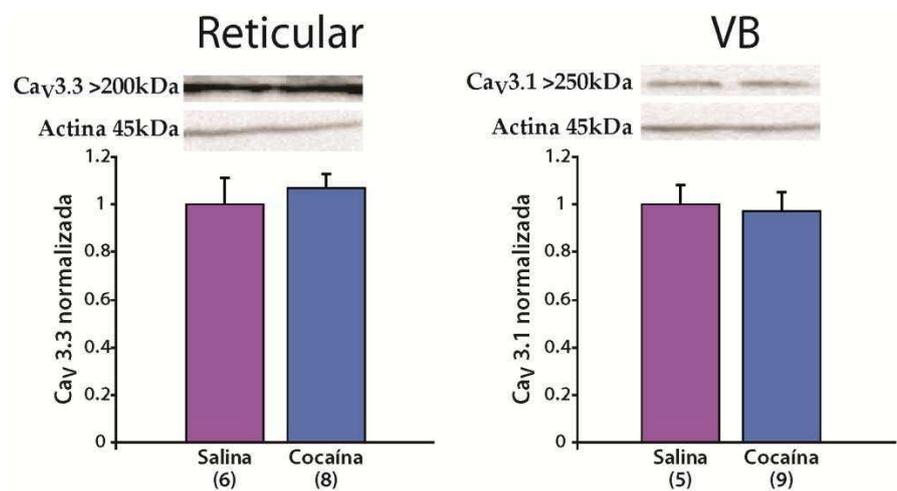


Figura 20. Efectos de la administración sub-crónica (tres días) de cocaína sobre los niveles de canales de calcio tipo T. Niveles de Ca_v3.3 y Ca_v3.1 medidos por *Western Blot*, obtenidos de los núcleos talámicos reticular y VB, relativizados a actina y al promedio de los valores obtenidos de animales tratados con solución fisiológica (salina). Los animales recibieron un *binge* de cocaína por día durante tres días consecutivos y fueron sacrificados 1h luego de la última inyección. Los valores entre paréntesis indican el número de muestras independientes utilizadas para el análisis (prueba *t* de Student).

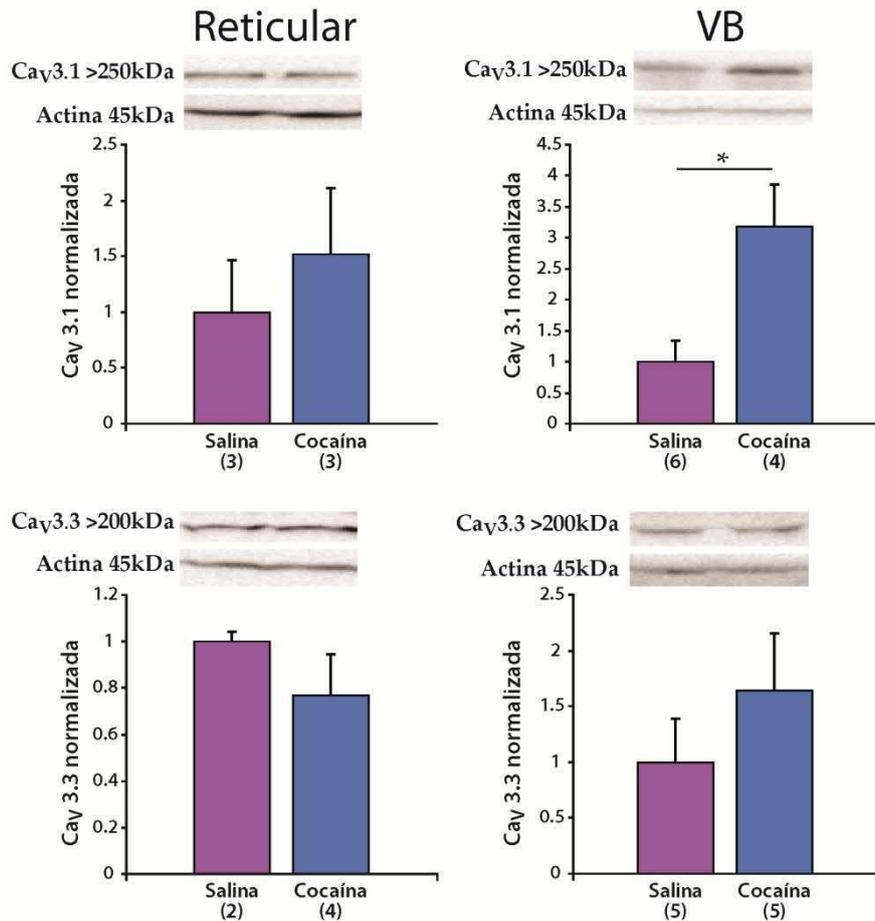


Figura 21. Efectos de la administración sub-crónica (tres días) de cocaína sobre los niveles de canales de calcio tipo T. Niveles de Ca_v3.3 y Ca_v3.1 medidos por *Western Blot*, obtenidos de los núcleos talámicos reticular y VB, relativizados a actina y al promedio de los valores obtenidos de animales tratados con solución fisiológica (salina). Los animales recibieron un *binge* de cocaína por día durante tres días consecutivos y fueron sacrificados 24h luego de la última inyección. Los valores entre paréntesis indican el número de muestras independientes utilizadas para el análisis (prueba *t* de Student). * $p=0,013$.

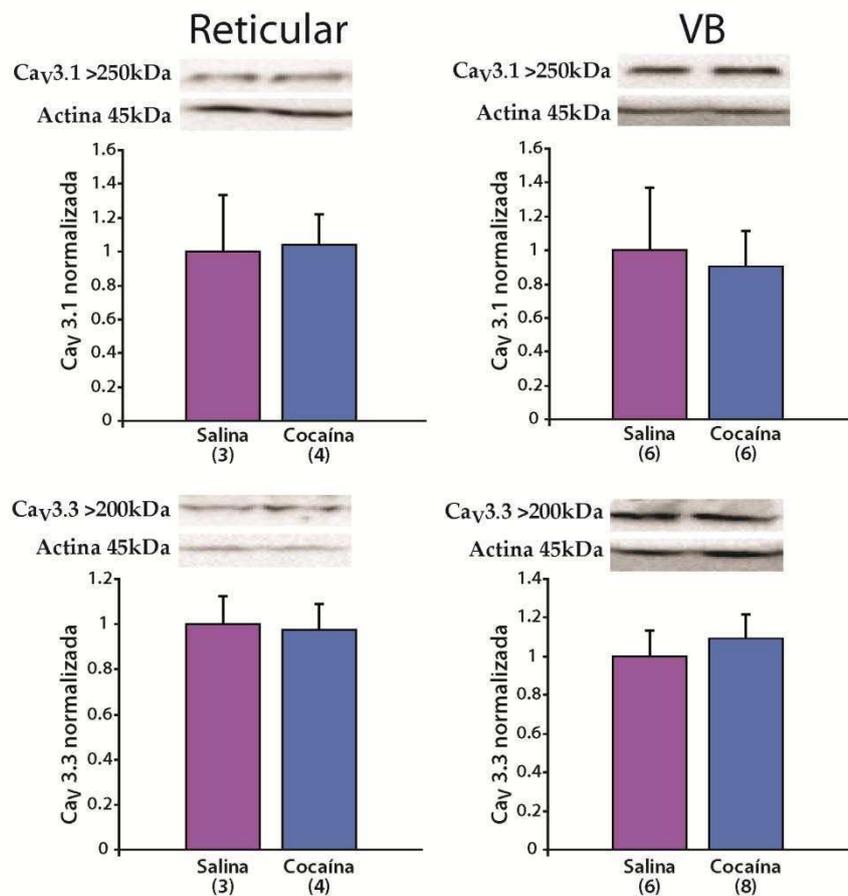


Figura 22. Efectos de la administración sub-crónica (cuatro días) de cocaína sobre los niveles de canales de calcio tipo T. Niveles de Ca_v3.3 y Ca_v3.1 medidos por *Western Blot*, obtenidos de los núcleos talámicos reticular y VB, relativizados a actina y al promedio de los valores obtenidos de animales tratados con solución fisiológica (salina). Los animales recibieron un *binge* de cocaína por día durante cuatro días consecutivos y fueron sacrificados 1h luego de la última inyección. Los valores entre paréntesis indican el número de muestras independientes utilizadas para el análisis (prueba *t* de Student).

Cabe destacar que el aumento del 300% en la expresión de Cav3.1 obtenido 24h luego de la última inyección del protocolo de tres días de *binge* (Figura 21) deja de observarse si se administra cocaína durante un día más y se sacrifica el animal 1h luego de la última inyección (Figura 22), hecho que sugiere la posibilidad de que los cambios homeostáticos mediados por la cocaína pueden generar fluctuaciones de la expresión de dicha proteína. Por otro lado, esta técnica no permite discernir si la subunidad 3.1 del canal de calcio tipo T se encuentra en los somas de las neuronas Ventrobasales o en las terminales de las neuronas reticulares que hacen sinapsis en el núcleo VB, aunque estudios en rata sugieren que esta subunidad no se expresa en el núcleo reticular, sino en el VB (Craig y cols., 1999; Talley y cols., 1999).

Los cambios observados en los niveles de GAD y Cav3.1 podrían estar asociados a cambios homeostáticos que mediarían las modificaciones en la transmisión GABAérgica y las corrientes de calcio vistas a nivel electrofisiológico, y dan cuenta de los efectos dañinos que el consumo de cocaína ejerce sobre el sistema ThCo.

4. Rol de la serotonina en la modulación GABAérgica tálamocortical inducida por cocaína

4.1. Efectos de la aplicación in vitro de serotonina sobre la liberación GABAérgica espontánea sobre el núcleo Ventrobasal talámico: registros de patch clamp en rodajas obtenidas de animales naïve.

Como se ha mencionado anteriormente, la cocaína es un psicoestimulante que provoca la inhibición de la recaptación de DA, NE y 5-HT, lo que lleva a un aumento en las concentraciones extracelulares de dichos neurotransmisores por un tiempo más prolongado que lo habitual. El circuito ThCo presenta regulación tanto por DA como por 5-HT a varios niveles (ver figura 5, introducción), por lo que el aumento en estas monoaminas a nivel sináptico podría estar involucrado en la modulación del fenómeno de disritmia ThCo. Por su parte, el MPH también se ha descrito como bloqueante de la recaptación sináptica de DA y NE, pero a diferencia de cocaína, no inhibe la recaptación de 5-HT (Kuczenski y Segal, 1997; Segal y Kuczenski, 1999).

Dados los resultados presentados en secciones anteriores, en los que se observa que los efectos de MPH sobre la transmisión GABAérgica del núcleo reticular sobre el VB son sutiles en comparación con los efectos de cocaína, planteamos como hipótesis que la cocaína provoca alteraciones en esta sinapsis principalmente a través de la disrupción de la regulación serotoninérgica.

En este apartado se describen los experimentos realizados tras la incubación de rodajas ThCo, obtenidas de animales *naïve*, con 5-HT (100 μ M) en la solución extracelular de registro por un mínimo de quince minutos. Se registraron corrientes miniatura GABAérgicas en neuronas del núcleo VB en presencia de DL-AP5, CNQX y TTX. La incubación con 5-HT llevó a un aumento en la frecuencia de minis de GABA, reflejado en una reducción del intervalo entre eventos (Figura 23). Estos resultados fueron similares a los obtenidos de rodajas de animales tratados con cocaína (Figura 10).

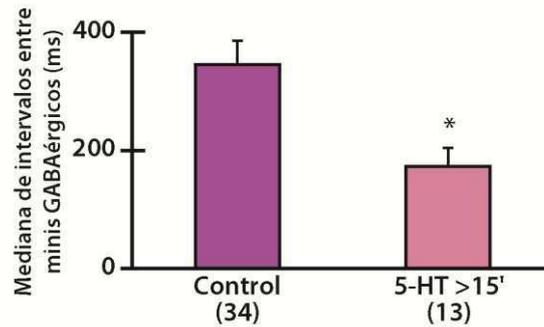


Figura 23. Efecto de la aplicación de 5-HT en la liberación espontánea de GABA sobre el núcleo VB. Medianas de los intervalos entre corrientes miniatura GABAérgicas registradas en neuronas control o en presencia de 5-HT 100 μ M por más de quince minutos. Los valores de las medianas se obtuvieron tras ajustar los datos de probabilidad acumulada a la siguiente función de crecimiento exponencial: $y = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot \text{tiempo})$. * $p < 0,05$. Los números entre paréntesis indican el número de neuronas registradas en cada grupo.

A fin de dilucidar qué receptores de 5-HT podrían estar mediando esta respuesta, se incubaron rodajas con DOI (10 μ M; agonista 5-HT_{2A/2C}) o con 8-OH-DPAT (10 μ M; agonista 5-HT_{1A}), también por un mínimo de 15 minutos (Figura 24). Asimismo se incubaron rodajas con antagonistas de los receptores D1 y D2 (SCH 23390 y sulpiride, respectivamente, ambos 25 μ M) en presencia de ambos agonistas serotoninérgicos (Figura 24) para descartar una posible modulación por DA sobre los efectos estudiados.

Con ambos tipos de agonistas serotoninérgicos se obtuvo un aumento en la frecuencia de minis de GABA, resultado que no se vio modificado por el agregado de antagonistas dopaminérgicos. Dada la aparente participación tanto de los receptores 5-HT_{2A/2C} como 5-HT_{1A}, se intentó bloquear el efecto de cocaína con antagonistas serotoninérgicos. Un grupo de animales recibieron un *binge* de cocaína tras la administración previa (30 minutos antes de la primera inyección de cocaína) de ketanserina, antagonista 5-HT_{2A/2C} (*i.p.* 1mg/kg), mientras que del grupo tratado únicamente con cocaína se separaron rodajas que se incubaron con NAN-190 (antagonista 5-HT_{1A}). En ninguno de los dos tratamientos se logró revertir o impedir el efecto de cocaína sobre el aumento en la frecuencia de minis GABAérgicos (Figura 25).

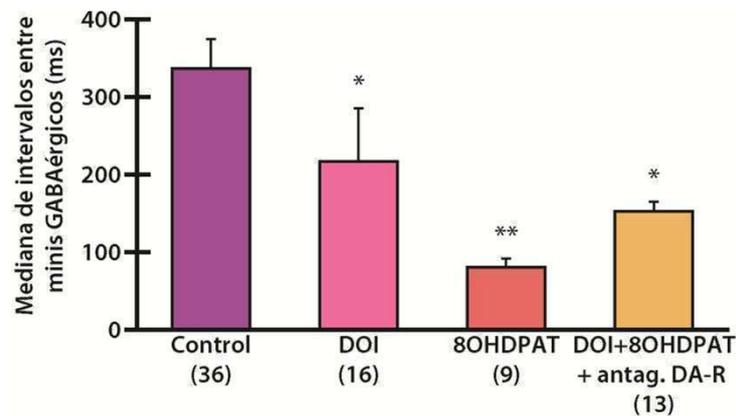


Figura 24. Efecto de la aplicación de agonistas serotoninérgicos en la liberación espontánea de GABA sobre el núcleo Ventrobasal. Medianas de los intervalos entre corrientes miniatura GABAérgicas registradas en neuronas control o en presencia de DOI 10 μ M, 8 OH DPAT 10 μ M o DOI 10 μ M +8 OH DPAT 10 μ M +SCH 23390 25 μ M +sulpiride 25 μ M por más de quince minutos. Los valores de las medianas se obtuvieron tras ajustar los datos de probabilidad acumulada a la siguiente función de crecimiento exponencial: $y = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot \text{tiempo})$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Los números entre paréntesis indican el número de neuronas del núcleo VB registradas en cada grupo.

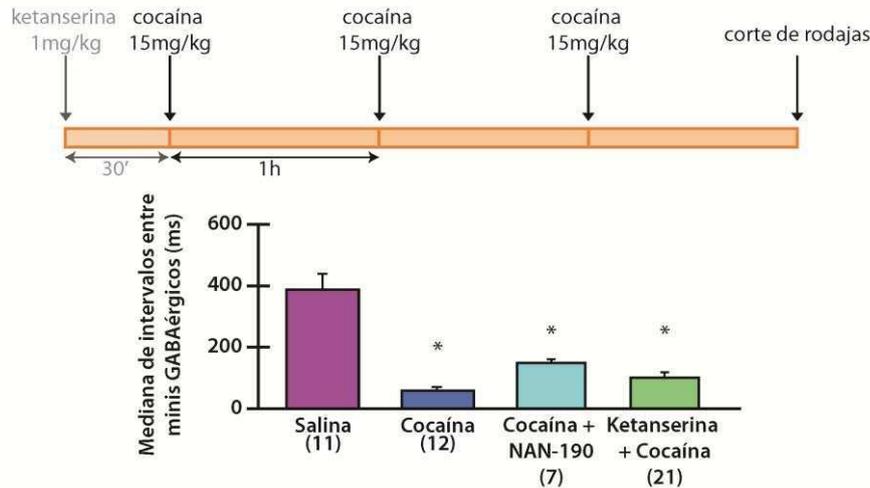


Figura 25. El bloqueo de receptores 5-HT_{1A} *in vitro* o 5-HT_{2A/2C} *in vivo* no evita el efecto de la administración aguda de cocaína sobre la liberación espontánea de GABA. Se muestra el protocolo de inyección utilizado en la parte superior, mientras que en la figura de barras inferior se muestran los promedios de las medianas de los intervalos entre corrientes miniatura GABAérgicas registradas en neuronas control (salino) o en neuronas provenientes de animales tratados con *binge* de cocaína en presencia o en ausencia de NAN-190 (100 μ M; solución extracelular de registro) o pretratados con ketanserina (i.p.). Los valores de las medianas se obtuvieron tras ajustar los datos de probabilidad acumulada a la siguiente función de crecimiento exponencial: $y = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot \text{tiempo})$. * $p < 0,05$. Los números entre paréntesis indican el número de neuronas del núcleo VB registradas en cada grupo.

Los resultados obtenidos tras la administración sistémica de ketanserina sugieren que los receptores 5-HT_{2A/2C} no estarían mediando los efectos de la cocaína sobre la neurotransmisión GABAérgica, mientras que los resultados de la aplicación de 5-HT, agonistas y/o antagonistas en la solución de registro no parecen tener efectos consistentes. En este sentido, la figura 26 ilustra cómo la incubación por más de 15 minutos con 5-HT da por resultado un aumento en la frecuencia (observada como una disminución en los intervalos entre eventos) de corrientes miniatura GABAérgicas para un amplio rango de concentraciones (0,1 μ M a 1mM). No se aprecian diferencias significativas en las medianas de los intervalos entre eventos para las distintas concentraciones de 5-HT utilizadas, lo que sugiere que en estas condiciones experimentales con 5-HT 0,1 μ M ya se satura la respuesta estudiada.

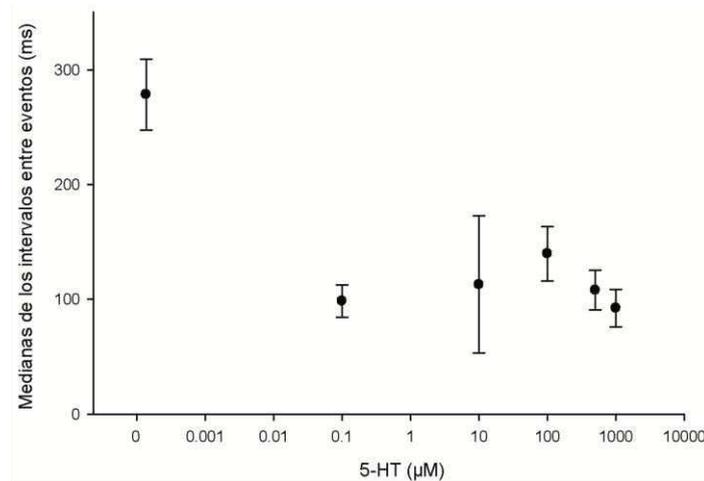


Figura 26. Efecto de distintas concentraciones de 5-HT aplicada *in vitro* sobre la liberación espontánea de GABA. Medianas de los intervalos entre corrientes miniatura GABAérgicas registradas en neuronas control o en presencia de 5-HT (en μ M: 0,1; 10; 100; 500; 1000) por más de quince minutos.

El conjunto de resultados, no del todo concluyentes, obtenidos tras la aplicación en la solución de registro de 5-HT o de agonistas/antagonistas de receptores de 5-HT podría entenderse como el producto de procesos de internalización de los receptores de 5-HT, que serían difícilmente cuantificables con las técnicas usadas en este trabajo de tesis (los procesos de internalización de receptores de 5-HT se han descrito

previamente tanto para la acción de agonistas como de antagonistas serotoninérgicos, Millan y cols., 2008). Dichos procesos de internalización generarían resultados contradictorios como los mostrados más arriba, donde los antagonistas tendrían un efecto facilitatorio de la liberación de GABA aun mayor que la propia 5-HT (Figura 24), así como una acción agonista similar de la 5-HT para rangos de concentración cuatro órdenes de magnitud diferentes (Figura 26).

4.2. Efectos de la aplicación local (*puff*) de serotonina sobre la liberación GABAérgica espontánea y las corrientes de calcio del núcleo Ventrobasal talámico: registros de patch clamp en rodajas obtenidas de animales knockout 5-HT_{2A}.

4.2.1. Estudio de los mecanismos presinápticos

En este apartado se describen los experimentos realizados para evaluar el efecto inmediato de la exposición a 5-HT mediante su aplicación localizada (*puff*) sobre las sinapsis GABAérgicas en estudio. El uso de un único *puff* de pocos segundos de duración nos permitió cuantificar los efectos de la 5-HT antes de que los receptores sufrieran procesos de internalización. La figura 6 en Metodología muestra cómo la aplicación de *puff* de Cd²⁺ puede bloquear de canales de calcio dependientes de voltaje presinápticos que median la liberación de GABA.

La aplicación de *puff* de 5-HT se realizó en rodajas provenientes de una cepa de ratones KO para el receptor 5-HT_{2A}, y sus respectivos WT, en el marco de una colaboración con el laboratorio de la Dra. Noelia Weisstaub (Grupo de Neurociencia de Sistemas, Facultad de Medicina, CONICET-UBA). Dado que las neuronas reticulares expresan los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} (Rodríguez y cols., 2011), el uso de estos animales facilita el estudio de las vías posibles de acción de la 5-HT sobre la liberación de GABA por parte del núcleo reticular.

El *background* genético de esta cepa no es C57 sino 129Sv/Ev, por lo que como primera medida se evaluó el efecto de la aplicación localizada de 5-HT (100µM, en solución extracelular, preparada justo antes de comenzar cada experimento) en animales *naïve* KO 5-HT_{2A} y WT 129Sv/Ev (Figura 27). Se observó que la aplicación de

un *puff* de solución extracelular de registro (aCSF) afectó la línea de base del registro (esto es, disminuyó la corriente de *holding*), sin alterar la frecuencia de minis de GABA (Figura 27A, registro superior). Si bien la amplitud del cambio en la línea de base varió entre experimentos (no se observó en todos los casos), un *puff* de 5-HT (100 μ M) produjo una disminución inmediata en la frecuencia y amplitud de corrientes miniatura GABAérgicas en rodajas obtenidas de ratones WT 129Sv/Ev y KO 5-HT_{2A}, (Figura 27A, registros intermedio e inferior). No se observaron diferencias significativas entre WT y KO 5-HT_{2A} al comparar los valores de frecuencia relativizada durante el *puff* (esto es, porcentaje de reducción de la frecuencia de minis respecto a la línea de base previa) y el porcentaje de recuperación post-*puff* (Figura 27B). Por otro lado, un *puff* de 5-HT de menor concentración (10 μ M) sólo redujo la liberación espontánea de GABA en rodajas procedentes de KO 5-HT_{2A}, pero no en los WT (Figura 28).

Los cambios observados en la frecuencia de minis sugirieron una acción moduladora de la 5-HT sobre la liberación espontánea de GABA desde las terminales presinápticas de las neuronas del núcleo Reticular. Es importante destacar que la 5-HT en ningún caso facilitó la liberación de GABA durante los experimentos realizados usando un *puff*. Estos resultados apoyarían nuestra hipótesis acerca de la existencia de un fenómeno homeostático compensatorio que se generaría tras la acción inhibitoria de la 5-HT sobre las terminales GABAérgicas de las neuronas reticulares. Asimismo, el grado de inhibición de la liberación de GABA dependió de la concentración de 5-HT usada, siendo los KO 5-HT_{2A} más sensibles a bajas concentraciones de 5-HT que los WT. Por último, la reducción en la amplitud de los minis durante el *puff* estaría mediada por una reducción en la resistencia de entrada de la neurona postsináptica descrita previamente por otros autores (esto es, asociada con la apertura de los receptores de 5-HT en las dendritas distales de las neuronas del VB; McCormick y Pape, 1990; Monckton y McCormick, 2002).

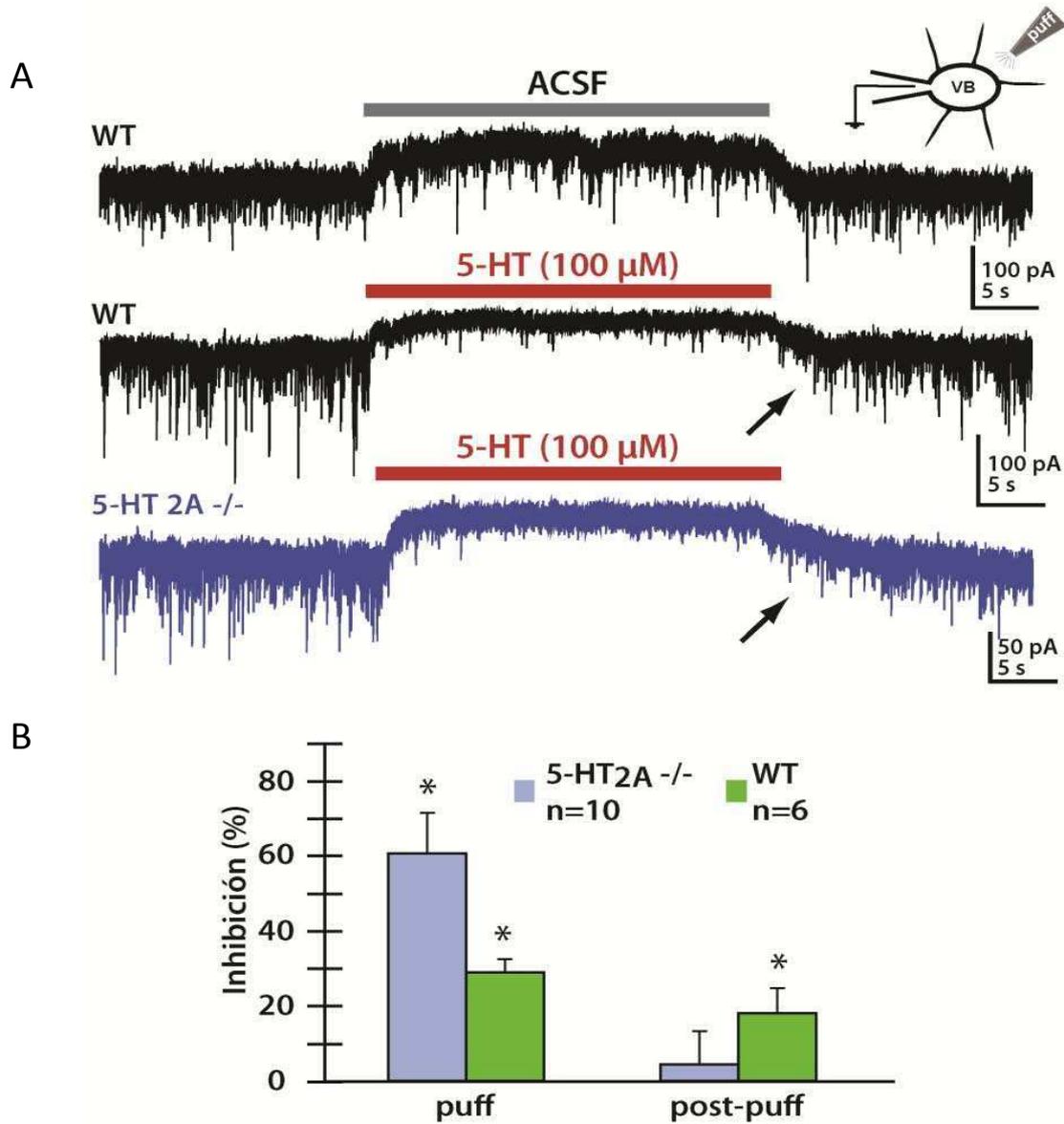


Figura 27. Efectos de la aplicación de un *puff* de 5-HT 100 μ M sobre la liberación espontánea de GABA. (A) Registros representativos de minis GABAérgicos en neuronas Ventrobasaes de rodajas obtenidas de animales 129Sv/Ev WT (trazos en negro) o KO 5-HT_{2A} (5-HT_{2A} -/-; trazo azul). Sobre cada registro se indica la aplicación localizada (*puff*) de solución de registro libre de 5-HT (aCSF) o con el añadido de 5-HT 100 μ M. La aplicación de aCSF no tiene efectos sobre la frecuencia de los minis, mientras que la de 5-HT produce una disminución marcada de esta variable. Las flechas muestran la reversibilidad de la aplicación de 5-HT sobre la frecuencia de minis. (B) Porcentaje de inhibición (respecto de la expresión previa al *puff* para cada neurona) de minis GABAérgicos durante el *puff* (30 segundos) de 5-HT 100 μ M y durante 1 minuto posterior a finalizar el *puff* (post-*puff*) para neuronas Ventrobasaes obtenidas de animales 5-HT_{2A} -/- (celeste) y WT (verde). El porcentaje de inhibición es estadísticamente significativo durante el *puff* para ambos grupos (prueba *t* de Student: 5-HT_{2A} -/-, $p=0,0003$; WT, $p=0,024$), pero sólo en el caso de los 5-HT_{2A} -/- se recuperan los valores de frecuencia previos al *puff* una vez finalizada la aplicación (prueba *t* de Student: 5-HT_{2A} -/-, $p=0,6$; WT, $p=0,038$). * $p<0,05$ respecto de la frecuencia de minis previa al *puff*.

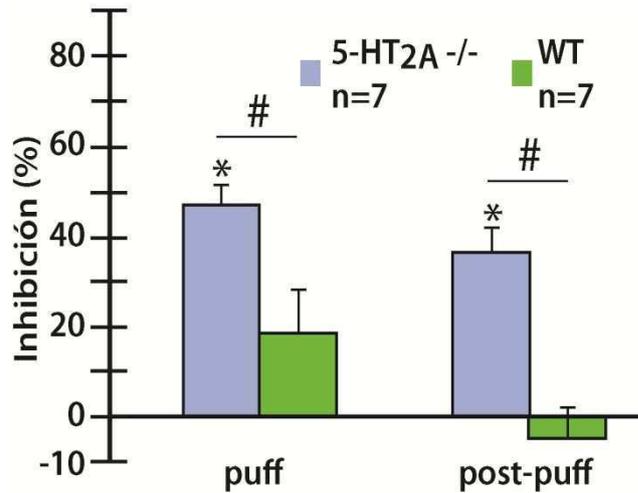


Figura 28. Efectos de la aplicación de un *puff* de 5-HT 10µM sobre la liberación espontánea de GABA. Porcentaje de inhibición (respecto de la expresión previa al *puff* para cada neurona) de minis GABAérgicos durante el *puff* (30 segundos) de 5-HT 10µM y durante 1 minuto posterior a finalizar el *puff* (*post-puff*) para neuronas Ventrobasales obtenidas de animales KO 5-HT_{2A} (5-HT_{2A} -/-; celeste) y 129Sv/Ev *wild-type* (WT; verde). El porcentaje de inhibición es estadísticamente significativo solamente para el grupo 5-HT_{2A} -/-, tanto durante el *puff* (prueba *t* de Student, $p < 0,0001$) como *post-puff* (prueba *t* de Student, $p = 0,0006$). * $p < 0,05$ respecto de la frecuencia de minis previa al *puff*. # $p < 0,05$, prueba *t* de Student comparando entre cepas.

A continuación se procedió a analizar la influencia del *puff* de 5-HT 100µM sobre los minis GABAérgicos en rodajas obtenidas de animales WT y KO 5-HT_{2A} tratados con un único *binge* de cocaína *in vivo* (Figura 29). El *puff* de 5-HT (100 µM) no provocó una reducción de la frecuencia de minis en los ratones WT, mientras que sí produjo una inhibición en las neuronas de animales KO 5-HT_{2A}, tanto durante el *puff* como en el período *post-puff*. El tratamiento con un *binge* de cocaína aumentó significativamente el porcentaje de inhibición *post-puff* en comparación con los animales 5-HT_{2A} tratados con solución salina (Figura 30).

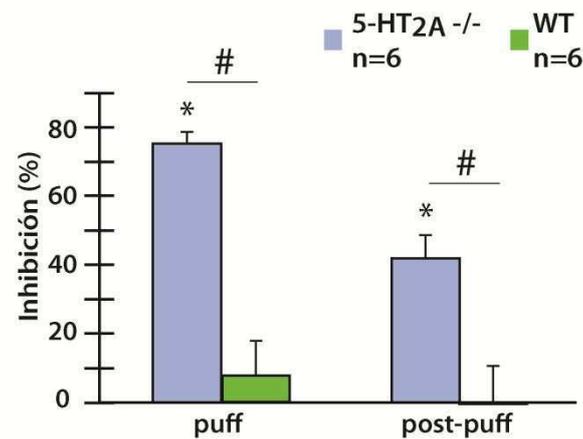


Figura 29. Efectos de la aplicación de un *puff* de 5-HT 100µM sobre la liberación espontánea de GABA en ratones tratados con un *binge* de cocaína *in vivo*. Porcentaje de inhibición (respecto de la expresión previa al *puff* para cada neurona) de minis GABAérgicos durante el *puff* (30 segundos) de 5-HT 100µM y durante 1 minuto posterior a finalizar el *puff* (*post-puff*) para neuronas Ventrobasales obtenidas de animales KO 5-HT_{2A} (5-HT_{2A}^{-/-}; celeste) y 129Sv/Ev WT (verde) tratados con un *binge* de cocaína y sacrificados una hora después de recibir la última inyección. El porcentaje de inhibición es estadísticamente significativo solamente para el grupo 5-HT^{-/-}, tanto durante el *puff* (prueba *t* de Student, $p < 0,0001$) como *post-puff* (prueba *t* de Student, $p = 0,0013$). * $p < 0,05$ respecto de la frecuencia de minis previa al *puff*. # $p < 0,05$, prueba *t* de Student comparando entre cepas.

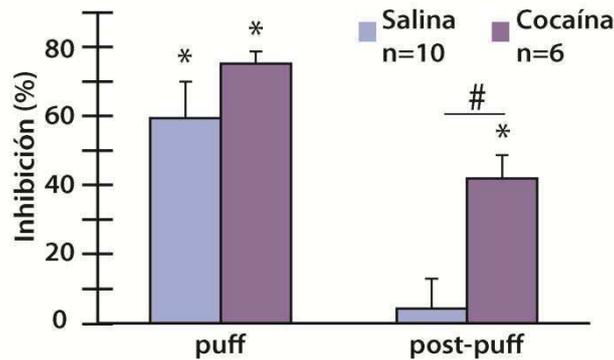


Figura 30. Comparación de los efectos de la aplicación de un *puff* de 5-HT 100 μ M sobre la liberación espontánea de GABA en rodajas obtenidas de ratones KO 5-HT_{2A} tratados con un *binge* de cocaína o de solución salina. Porcentaje de inhibición (respecto de la expresión previa al *puff* para cada neurona) de minis GABAérgicos durante el *puff* (30 segundos) de 5-HT 100 μ M y durante 1 minuto posterior a finalizar el *puff* (*post-puff*) para neuronas Ventrobasales obtenidas de animales KO 5-HT_{2A} tratados con un *binge* de solución salina (celeste) o con un *binge* de cocaína (violeta) y sacrificados una hora después de recibir la última inyección. El porcentaje de inhibición es estadísticamente significativo durante el *puff* para ambos grupos (prueba *t* de Student: salina, $p=0,0003$; cocaína, $p<0,0001$), pero sólo en el caso de los salinos se recuperan los valores de frecuencia previos al *puff* una vez finalizada la aplicación (prueba *t* de Student: salina, $p=0,624$; cocaína, $p=0,0013$). * $p<0,05$ respecto de la frecuencia de minis previa al *puff*. # $p=0,0092$, prueba *t* de Student para la inhibición *post-puff*, salina vs. cocaína.

Este grupo de resultados sugiere que un *binge* de cocaína induciría cambios en la expresión y/o acoplamiento inhibitorio de los receptores de 5-HT en las terminales GABAérgicas del núcleo Reticular. Se ha descrito en rata que un *binge* de cocaína redujo la densidad de receptores de tipo 5-HT_{1A} en el hipocampo e hipotálamo, sin inducir cambios en la densidad de los receptores de tipo 5-HT_{2A} (Perret y cols., 1998). También se ha descrito en hurón que los receptores 5-HT_{1A} pueden aumentar la liberación de GABA desde interneuronas locales talámicas (Monckton y McCormick, 2002). Por lo tanto, decidimos continuar estudiando cual podría ser el papel de los receptores de tipo 5-HT_{1A} sobre la liberación de GABA en rodajas obtenidas de ratones KO 5-HT_{2A} (Figura

31). Usamos para tal efecto el antagonista 5-HT_{1A} específico NAN-190, y observamos que la aplicación de NAN-190 fue capaz de reducir significativamente la inhibición de la liberación de GABA mediada por un *puff* de 5-HT (100 μM) en los KO 5-HT_{2A}. Estos resultados sigieren que los receptores 5-HT_{1A} mediarían los efectos inhibitorios sobre la liberación de GABA en las terminales del núcleo Reticular en ausencia de los receptores de tipo 5-HT_{2A}. Por lo tanto, se podría concluir que en rodajas obtenidas de animales WT un *puff* de 5-HT (100 μM) inhibe en menor medida la liberación de GABA debido a una acción “facilitatoria” de los receptores 5-HT_{2A} que compensaría parcialmente el papel “inhibitorio” de los receptores 5-HT_{1A}.

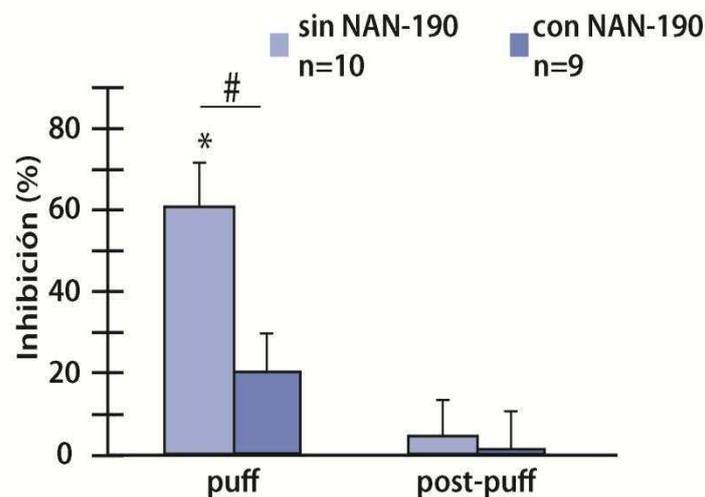


Figura 31. Efectos de la aplicación de un *puff* de 5-HT 100μM sobre la liberación espontánea de GABA durante la inhibición de los receptores 5-HT_{1A} en rodajas obtenidas de ratones KO 5-HT_{2A} naïve. Porcentaje de inhibición (respecto de la expresión previa al *puff* para cada neurona) de minis GABAérgicos durante el *puff* (30 segundos) de 5-HT 100μM, ya sea sola (barras claras) o junto con NAN-190 100 μM (barras oscuras), y durante 1 minuto posterior a finalizar el *puff* (*post-puff*) para neuronas Ventrobasales obtenidas de animales KO 5-HT_{2A}. El porcentaje de inhibición es estadísticamente significativo **solamente** durante el *puff* para el grupo sin NAN-190 (prueba *t* de Student, $p=0.0003$). * $p<0,05$ respecto de la frecuencia de minis previa al *puff*. # $p=0,0128$, prueba *t* de Student comparando entre grupos.

A modo de resumen, los mecanismos presinápticos observados fueron:

- Un *puff* de 5-HT (incluso a baja concentración de 5-HT) fue capaz de inhibir la liberación de GABA desde las terminales del núcleo Reticular en rodajas obtenidas de ratones WT.
- Los receptores 5-HT_{1A} mediarían dicha inhibición sobre la liberación de GABA. Por otro lado, la inhibición mediada por los receptores 5-HT_{1A} estaría compensada por mecanismos “facilitatorios” mediados por los receptores de tipo 5-HT_{2A}.
- Un *binge* de cocaína prolongó el rol inhibitorio de los receptores 5-HT_{1A}.

4.2.2. Estudio de los mecanismos postsinápticos

Los resultados presentados en la sección 2.1 de esta tesis muestran que un *binge* de cocaína cambió la relación de amplitudes de las corrientes de calcio (corrientes tipo T/ corrientes tipo P/Q) en las neuronas postsinápticas del núcleo VB. En este apartado se evaluó la posibilidad de que este fenómeno estuviera mediado por la existencia de una modulación dependiente de 5-HT.

Continuamos estudiando los efectos postsinápticos de la aplicación de un *puff* de 5-HT (100 μ M) durante la aplicación de un protocolo de pulsos cuadrados despolarizantes para generar corrientes de calcio de bajo y de alto umbral, tanto en animales WT (Figura 32A) como en los KO 5-HT_{2A} (Figura 32B). Se usaron pulsos cuadrados (80 ms de duración) que despolarizaron el potencial de *holding* desde -50 mV hasta -10 mV sin sustraer las corrientes de fuga o capacitivas. Este protocolo nos permitió registrar en menos de 12 segundos la corriente total de las neuronas postsinápticas VB en estudio durante los períodos pre-*puff* (línea de base), *puff* y post-*puff* (Figura 32).

Se observó que tras la aplicación del *puff* de 5-HT (100 μ M), la amplitud de corrientes de calcio de alto umbral (esto es, amplitudes de corriente de calcio generadas con pulsos de voltaje a valores entre -30 y -15 mV; Figura 32) se vio disminuida en los animales WT y se recuperó parcialmente tras veinte minutos de lavado de la 5-HT

(Figura 32A). No se observó efecto sobre las corrientes de alto umbral en los KO 5-HT_{2A} (Figura 32B).

Continuamos estudiando en mayor detalle los cambios en la amplitud de las corrientes de bajo umbral de tipo T durante la aplicación de un *puff* de 5-HT (100 μ M) y 5-7 minutos *post-puff* (Figura 33). Si bien no se observó una disminución significativa en la amplitud de corriente de tipo T durante el *puff* (Figura 33A), la densidad de corriente T aumentó significativamente en el período *post-puff* para los KO 5-HT_{2A} (Figura 33B). En valores absolutos, la densidad de corriente durante el período *post-puff* de los WT fue $-6,2 \pm 2,3$ pA/pF (n=6) y de los KO 5-HT_{2A} fue $-17,4 \pm 2,7$ pA/pF (n=6) (prueba *t* de Student; $p < 0,05$).

Estos resultados sugieren la existencia de una modulación negativa, mediada por receptores tipo 5-HT_{2A}, de las corrientes de calcio de alto y bajo umbral postsinápticas de las neuronas del VB. En rodajas de ratones KO 5-HT_{2A} se observó un aumento de la densidad de corriente de tipo T durante el período *post-puff*.

Es importante destacar que los resultados obtenidos aquí usando un *puff* de 5-HT (100 μ M) muestran efectos contrarios a los descritos en la bibliografía (Berger y Takahashi, 1990; Fraser y MacVicar, 1991). Dichas discrepancias se pueden atribuir a que en los trabajos citados la aplicación de 5-HT fue realizada por incubación en la solución de registro, lo que permitiría los procesos de internalización de receptores de 5-HT, resultando en el estadio estacionario en un aumento de la magnitud de las corrientes de calcio.

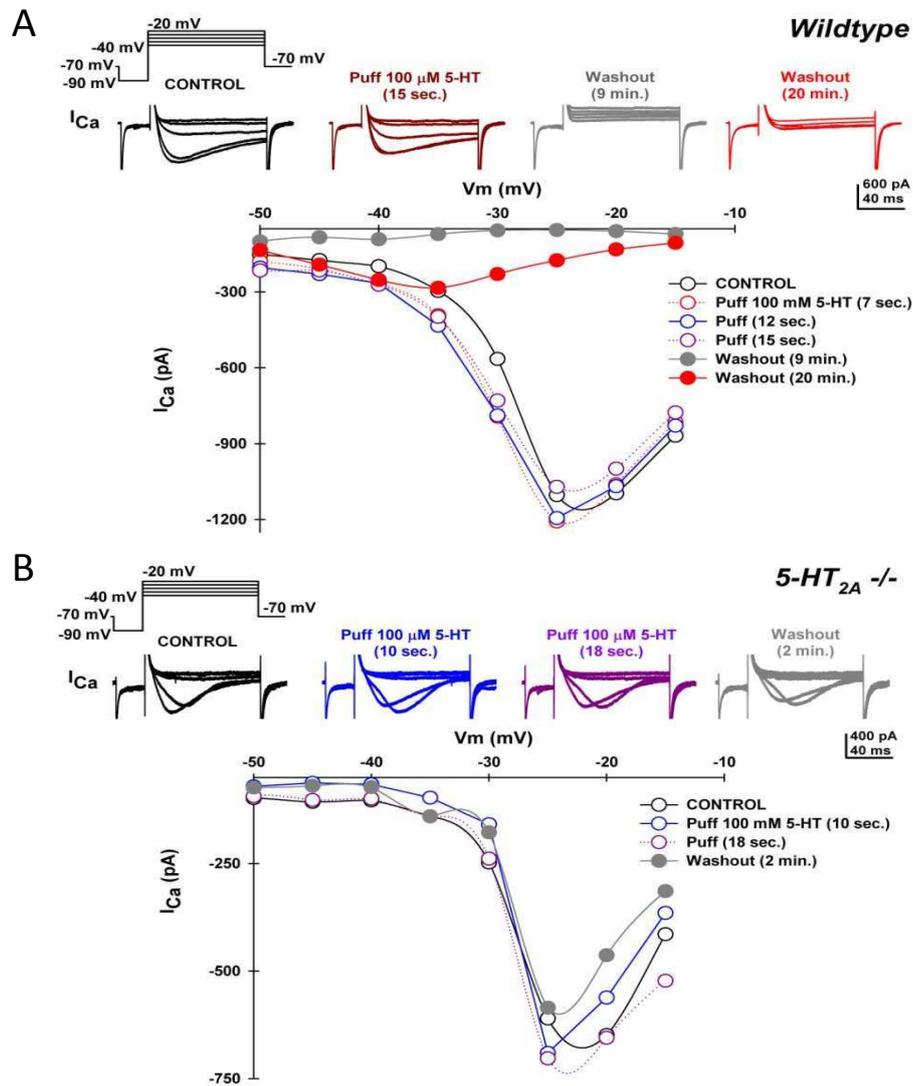


Figura 32. Efectos de la aplicación de un *puff* de 5-HT 100 μ M sobre las corrientes de calcio postsinápticas. Corriente de calcio en función del voltaje para neuronas Ventrobasales de rodajas obtenidas de ratones (A) 129Sv/Ev *wild-type* o (B) 5-HT_{2A} *-/-*, sometidas a un *puff* de 5-HT 100 μ M de 20 segundos de duración. El registro de corrientes mediante el protocolo de pulsos cuadrados se realizó antes, durante y luego de finalizado el *puff*.

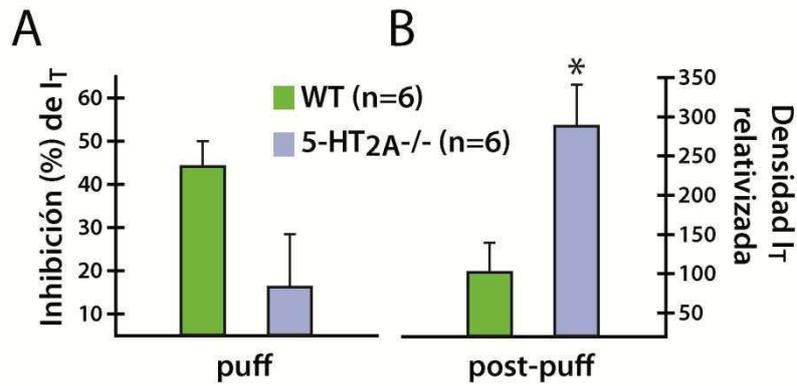


Figura 33. Efectos de la aplicación de un *puff* de 5-HT 100 μ M sobre las corrientes de tipo T. (A) Inhibición de la amplitud de corriente de tipo T (valores máximos de corriente T a valores de *holding* de -35 mV) durante el *puff*. (B) Densidad promedio de la corriente de tipo T durante el período *post-puff* expresada como el porcentaje de cambio de los valores de los WT. Prueba *t* de Student; * $p < 0,05$ respecto las densidades de corriente tipo T para neuronas Ventrobasales de rodajas obtenidas de ratones 129Sv/Ev WT.

A modo de resumen, los mecanismos postsinápticos observados fueron:

- Un *puff* de 5-HT fue capaz de inhibir las corrientes de calcio de alto umbral postsinápticas a través de la activación de los receptores de tipo 5-HT_{2A}.
- En rodajas de ratones KO 5-HT_{2A} se observó un aumento de la densidad de corriente de tipo T durante el período *post-puff*. El mecanismo responsable de este aumento de corriente T aún necesita ser estudiado en detalle. Sin embargo, un aumento de la densidad de corriente T posterior a la presencia de 5-HT podría ser un fenómeno asociado con el aumento en la relación de corrientes LVA/HVA observado previamente tras un *binge* de cocaína (Urbano y cols., 2009; Bisagno y cols., 2010).

4.3. Efectos de la aplicación local (*puff*) de serotonina sobre la corriente I_H y su rol en la neurotransmisión GABAérgica espontánea del núcleo Ventrobasal talámico: registros de patch clamp en rodajas obtenidas de animales knockout 5-HT_{2A}.

Nuestro grupo ha descrito un aumento drástico de la densidad de corriente I_H en las neuronas VB de ratones tratados con un *binge* de cocaína (Urbano y cols., 2009). Otros autores han descrito que los receptores 5-HT_{1A} en rodajas de hurón mediarían la despolarización de neuronas ThCo (McCormick y Pape, 1990a) a través de un cambio en la curva de activación de las corrientes I_H (se sabe que estas corrientes I_H están mediadas por las subunidades HCN2 y HCN4, que presentan cinéticas de activación lentas y son menos sensibles al AMPc intracelular; ver Santoro y cols., 2000). Sin embargo, los efectos excitatorios mediados por 5-HT en el núcleo Reticular del tálamo solamente se han descrito a nivel somático (McCormick y Wang, 1991).

Es importante destacar que la corriente I_H se encuentra activa a potenciales de membrana de reposo y juega un papel importante en el control del potencial de membrana, de manera tal que tras su bloqueo se esperaría una hiperpolarización de la membrana de las terminales GABAérgicas del núcleo Reticular (Lüthi y cols. 1998), lo que reduciría aun más la entrada de Ca^{2+} , con la consiguiente disminución en la liberación de GABA. Asimismo, lo contrario también sería correcto: una mayor activación basal de la corriente I_H redundaría en una mayor despolarización de la terminal y posterior aumento de la liberación de GABA.

En esta sección se describen los experimentos realizados para evaluar la posible interacción entre la corriente I_H y los receptores 5-HT_{1A} en las terminales GABAérgicas del núcleo Reticular del tálamo usando un *puff* de 5-HT (100 μ M). Estudiamos los cambios en la frecuencia de minis y su recuperación en rodajas provenientes de ratones KO 5-HT_{2A}, en ausencia (Figura 34, barras celestes) o presencia del bloqueante específico de las corrientes I_H , ZD-7288 (10 μ M aplicado tanto a la solución de registro como a la pipeta de *puff*; Figura 34, barras rosadas; Lüthi y cols., 1998).

En ausencia de corriente I_H (esto es, en presencia de ZD-7288) se redujo significativamente el porcentaje de bloqueo de la frecuencia de minis de GABA durante un *puff* de 5-HT (100 μ M), mientras que el bloqueo fue mayor también durante el

período *post-puff*. El efecto encontrado fue contrario al esperado descrito más arriba, es decir, la activación basal estaría mediando un efecto inhibitorio que promovería una mayor reducción de la liberación de GABA durante el *puff* de 5-HT (100 μ M). Por otro lado, el efecto prolongado que incluyó el período *post-puff* se asemejó a lo encontrado en rodajas obtenidas de ratones WT (ver figura 27). Estos resultados describen un nuevo mecanismo de modulación de la liberación de GABA por la corriente I_H que implicaría la interacción sinérgica de dicha corriente con los receptores de tipo 5-HT_{1A}.

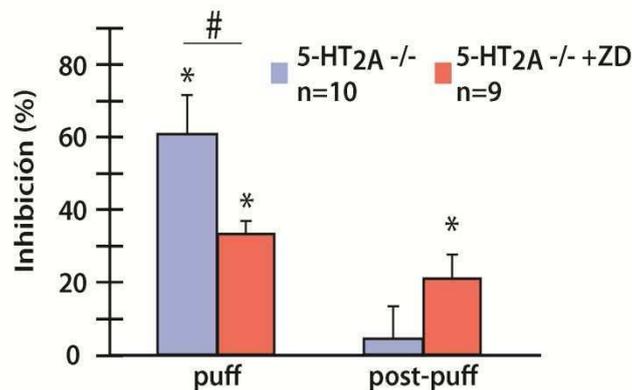


Figura 34. Efectos de la aplicación de un *puff* de 5-HT 100 μ M sobre la liberación espontánea de GABA durante la inhibición de la corriente I_H . Porcentaje de inhibición (respecto de la expresión previa al *puff* para cada neurona) de minis GABAérgicos durante el *puff* (30 segundos) de 5-HT 100 μ M y durante 1 minuto posterior a finalizar el *puff* (*post-puff*) para neuronas Ventrobasales obtenidas de animales KO 5-HT_{2A}, en ausencia (celeste) o en presencia (rosa) de ZD-7288, inhibidor de la corriente I_h (10 μ M; incubación mínima de 15 minutos). El porcentaje de inhibición es estadísticamente significativo durante el *puff* para ambos grupos (prueba *t* de Student: sin ZD-7288, $p=0,0003$; con ZD-7288, $p=0,0105$), pero sólo en ausencia de ZD-7288 se recuperan los valores de frecuencia previos al *puff* una vez finalizada la aplicación (prueba *t* de Student: sin ZD-7288, $p=0,624$; con ZD-7288, $p=0,0017$). * $p<0,05$ respecto de la frecuencia de minis previa al *puff*. # $p=0,0412$, prueba *t* de Student para la inhibición durante el *puff*, sin ZD-7288 vs. con ZD-7288

En presencia de ambos I_H y 5-HT_{1A} la inhibición de la liberación de GABA observada fue máxima.

Los resultados hasta aquí expuestos sugieren que durante la aplicación del *puff* de 5-HT 100 μ M se activarían receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}, ubicados en las terminales presinápticas de las neuronas del núcleo Reticular. Un *binge* de cocaína prolongó temporalmente el efecto inhibitorio de los receptores 5-HT_{1A}, lo que llevó a una inhibición significativa de la liberación de GABA durante el período *post-puff*.

Asimismo, los 5-HT_{2A} se encontrarían modulando las corrientes de calcio de las neuronas postsinápticas del núcleo VB, en acuerdo con reportes previos basados en técnicas morfológicas (Rodríguez y cols., 2011).

El uso combinado de NAN-190 y los KO 5-HT_{2A} nos permitió estudiar el papel de los receptores presinápticos de tipo 5-HT_{1A} sobre la liberación de GABA desde las terminales de las neuronas del núcleo Reticular. La localización de este receptor en los somas y las dendritas de las neuronas del núcleo Reticular ya ha sido descrita por otros autores (Rodríguez y cols., 2011).

Nuestros resultados también nos permiten sugerir un mecanismo novedoso de interacción de la I_H con los receptores 5-HT_{1A} a nivel de las terminales GABAérgicas del núcleo Reticular. Dicha interacción se ha descrito solamente a nivel somático (Monckton y McCormick, 2002). Nuestros resultados sugieren que la activación basal de la corriente I_H mediaría una acción sinérgica con los receptores 5-HT_{1A} que resultaría en una mayor inhibición de la liberación de GABA en rodajas obtenidas de los KO 5-HT_{2A}.

DISCUSIÓN GENERAL

La figura 35 resume los mecanismos canónicos descritos en la bibliografía que estarían mediando los efectos modulatorios de la 5-HT sobre la transmisión GABAérgica entre las neuronas del núcleo Reticular y las neuronas del núcleo VB. Es esperable que las vías intracelulares indicadas también medien las diferencias observadas entre cocaína y metilfenidato sobre el sistema ThCo.

En nuestro modelo, la 5-HT fue capaz de modular tanto la liberación de GABA desde las terminales presinápticas del núcleo Reticular talámico como las corrientes de calcio dependientes de voltaje presentes en las neuronas postsinápticas del núcleo VB. El uso de antagonistas específicos y ratones KO 5-HT_{2A} nos permitió demostrar la presencia de receptores **5-HT_{1A}** y **5-HT_{2A}** en las presinapsis mientras que sólo los receptores **5-HT_{2A}** modularían las corrientes de calcio de alto umbral de las neuronas VB.

El aumento de la concentración extracelular de 5-HT, tras ser liberada de las terminales presinápticas procedentes principalmente del núcleo dorsal del Rafe, localizado en el tronco del encéfalo, se produciría por la inhibición de la cocaína de la recaptación de 5-HT a través del transportador **SERT**. Se ha descrito que los receptores **5-HT_{1A}** (mediante la activación de proteínas $G_{i/o}$) inhiben la enzima adenilato ciclasa (**AC**) y median el bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje, mientras que aumentan la probabilidad de apertura de rectificadores anómalos de potasio (**GIRK**, *G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels*; Millan y cols., 2008). La apertura de canales GIRK mediaría la hiperpolarización de la membrana presináptica, lo que facilitarían la apertura de canales I_H y disminuiría así la resistencia de entrada de la terminal (“*shunting* de membrana”). Este mecanismo de activación de la corriente I_H sería consistente con la reducción de la liberación de GABA observada en rodajas obtenidas de ratones KO 5-HT_{2A}.

Por otro lado, los receptores **5-HT_{2A}** contrarrestarían la inhibición de la liberación mediada por los receptores **5-HT_{1A}** a través del aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular mediado por el aumento de **IP₃** que ha sido descrito previamente (Millan y cols., 2008). A nivel postsináptico, la activación de los receptores **5-HT_{2A}** mediaría la inhibición rápida de los canales de calcio dependientes de voltaje de alto umbral, mientras que aumentarían las corrientes de calcio de bajo umbral, de tipo T, posteriormente a la presencia de 5-HT. Los mecanismos descritos en esta figura podrían

estar desencadenando los **cambios homeostáticos compensatorios** que explicarían las modificaciones a nivel sináptico y de expresión proteica de GAD y Cav3.1 descritos en esta tesis.

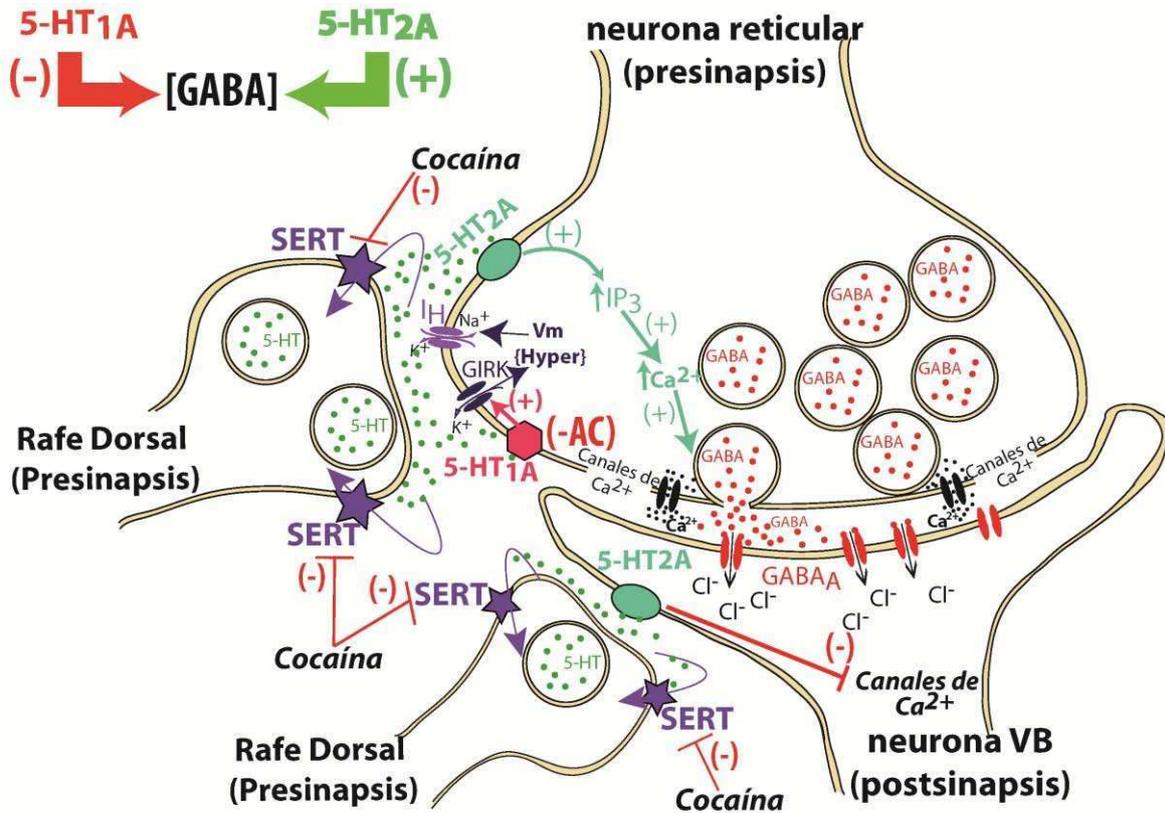


Figura 35. Resumen ilustrativo de las posibles vías intracelulares que mediarían los efectos de la 5-HT en las sinapsis GABAérgicas de las neuronas reticulares talámicas sobre las Ventrobasales. Cocaína actúa como inhibidor del transportador de 5-HT (SERT), lo que ocasiona un aumento en los niveles extracelulares de 5-HT. Los receptores 5-HT_{2A} presentes en las neuronas del núcleo reticular provocarían un aumento en los niveles intracelulares de calcio (vía IP₃), lo que podría facilitar la liberación de GABA. Por otro lado, los receptores 5-HT_{1A} en estas mismas neuronas actuarían sobre canales GIRK, lo que llevaría a una hiperpolarización de la membrana con la consiguiente activación de la corriente I_H, inhibiendo así la liberación de GABA por *shunting* de membrana.

CONCLUSIONES

- Tanto cocaína como MPH producen aumentos en la actividad locomotora con administración sub-crónica *in vivo*, aunque sólo cocaína induce un proceso de sensibilización.
- El aumento en la frecuencia de minis GABAérgicos se genera por administración aguda o sub-crónica *in vivo* de cocaína, pero en el caso de MPH sólo se observó tras una administración sub-crónica.
- El “washout” de cocaína luego de la administración sub-crónica induce facilitación de la transmisión GABAérgica a alta frecuencia, mientras que la administración sub-crónica *in vivo* provoca una mayor liberación asincrónica de GABA a bajas frecuencias. Ambos resultados sugieren que la cocaína mediaría una regulación homeostática de la actividad del sistema tálamocortical.
- La aplicación *in vitro* de cocaína genera una disminución en la frecuencia de disparo de potenciales de acción en las neuronas reticulares. En contraposición, MPH no afecta esta variable.
- La administración sub-crónica *in vivo* de cocaína indujo un aumento en los niveles de proteína de GAD en el núcleo reticular y, 24h después, un aumento en los niveles de Cav3.1 en el núcleo Ventrobasal.
- Los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} están presentes en las terminales GABAérgicas del núcleo reticular. Los receptores 5-HT_{2A} también se encuentran en las neuronas Ventrobasales, donde modulan de forma negativa las corrientes de calcio de bajo y alto umbral.
- La activación de los receptores 5-HT_{2A} modula de forma positiva la liberación de GABA, mientras que la activación de los receptores 5-HT_{1A} la inhibe por un mecanismo que involucra la corriente I_H.
- La administración aguda *in vivo* de cocaína alteró la modulación presináptica de la liberación de GABA desde las terminales del núcleo reticular mediada por cambios en la actividad de los receptores 5-HT_{2A}.

Referencias.

A

- Ade, K. K., Janssen, M. J., Ortinski, P. I., y Vicini, S. (2008). Differential tonic GABA conductances in striatal medium spiny neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(5), 1185–97. doi:10.1523/JNEUROSCI.3908-07.2008
- Akaike, N., Kostyuk, P. G., y Osipchuk, Y. V. (1989). Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *The Journal of Physiology*, 412, 181–195.
- Albin, R. L., Young, A. B., y Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366–75.
- Ali, A. B., y Nelson, C. (2006). Distinct Ca²⁺ channels mediate transmitter release at excitatory synapses displaying different dynamic properties in rat neocortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 16(3), 386–93. doi:10.1093/cercor/bhi117
- Andersen, P., y Curtis, D. R. (1964). The pharmacology of the synaptic and acetylcholine-induced excitation of ventrobasal thalamic neurones. *Acta Physiologica Scandinavica*, 61, 100–20. doi:10.1111/j.1748-1716.1964.tb02946.x
- Anderson, A. L., Li, S.-H., Biswas, K., McSherry, F., Holmes, T., Iturriaga, E., ... Elkashef, A. M. (2012). Modafinil for the treatment of methamphetamine dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 120(1-3), 135–41. doi:10.1016/j.drugalcdep.2011.07.007
- Arcelli, P., Frassoni, C., Regondi, M. C., Biasi, S. D., y Spreafico, R. (1996). GABAergic neurons in mammalian thalamus: A marker of thalamic complexity? *Brain Research Bulletin*, 42, 27–37. doi:10.1016/S0361-9230(96)00107-4
- Azmitia, E. C., y Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 179(3), 641–67. doi:10.1002/cne.901790311

B

- Baines, R. A. (2003). Postsynaptic protein kinase A reduces neuronal excitability in response to increased synaptic excitation in the *Drosophila* CNS. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(25), 8664–72.
- Bal, T., y McCormick, D. A. (1993). Mechanisms of oscillatory activity in guinea-pig nucleus reticularis thalami in vitro: a mammalian pacemaker. *The Journal of Physiology*, 468, 669–91.
- Ballon, J. S., y Feifel, D. (2006). A systematic review of modafinil: Potential clinical uses and mechanisms of action. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 67(4), 554–66.
- Beaulieu, J.-M., y Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182–217. doi:10.1124/pr.110.002642
- Behrendt, R.-P. (2006). Dysregulation of thalamic sensory “transmission” in schizophrenia: neurochemical vulnerability to hallucinations. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 20(3), 356–72. doi:10.1177/0269881105057696

- Berger, A. J., y Takahashi, T. (1990). Serotonin enhances a low-voltage-activated calcium current in rat spinal motoneurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(6), 1922–8.
- Biederman, J., Wilens, T., Mick, E., Spencer, T., y Faraone, S. V. (1999). Pharmacotherapy of attention-deficit/hyperactivity disorder reduces risk for substance use disorder. *Pediatrics*, 104(2), e20.
- Bisagno, V., Raineri, M., Peskin, V., Wikinski, S. I., Uchitel, O. D., Llinás, R. R., y Urbano, F. J. (2010). Effects of T-type calcium channel blockers on cocaine-induced hyperlocomotion and thalamocortical GABAergic abnormalities in mice. *Psychopharmacology*, 212(2), 205–14. doi:10.1007/s00213-010-1947-z
- Björklund, A., Falck, B., y Stenevi, U. (1971). Classification of monoamine neurones in the rat mesencephalon: distribution of a new monoamine neurone system. *Brain Research*, 32(2), 269–85.
- Blue, M. E., Erzurumlu, R. S., y Jhaveri, S. (1991). A comparison of pattern formation by thalamocortical and serotonergic afferents in the rat barrel field cortex. *Cerebral Cortex*, 1(5), 380–9.
- Bonanno, G., Fassio, A., Schmid, G., Severi, P., Sala, R., y Raiteri, M. (1997). Pharmacologically distinct GABAB receptors that mediate inhibition of GABA and glutamate release in human neocortex. *British Journal of Pharmacology*, 120(1), 60–4. doi:10.1038/sj.bjp.0700852
- Bonnin, A., Peng, W., Hewlett, W., y Levitt, P. (2006). Expression mapping of 5-HT1 serotonin receptor subtypes during fetal and early postnatal mouse forebrain development. *Neuroscience*, 141(2), 781–94. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.04.036
- Bowery, N. G., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J. P., Marshall, F., Raiteri, M., ... Enna, S. J. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacological Reviews*, 54(2), 247–64.
- Brandon, C. L., Marinelli, M., Baker, L. K., y White, F. J. (2001). Enhanced reactivity and vulnerability to cocaine following methylphenidate treatment in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 25(5), 651–61. doi:10.1016/S0893-133X(01)00281-0
- Brickley, S. G., Cull-Candy, S. G., y Farrant, M. (1996). Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABAA receptors. *The Journal of Physiology*, 497 (Pt 3), 753–9.

C

- Caddick, S. J., Wang, C., Fletcher, C. F., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., y Hosford, D. A. (1999). Excitatory but not inhibitory synaptic transmission is reduced in lethargic (Cacnb4(lh)) and tottering (Cacna1atg) mouse thalami. *Journal of Neurophysiology*, 81(5), 2066–74.
- Cadet, J.L., y Bisagno, V. (2013). The primacy of cognition in the manifestations of substance use disorders. *Front Neurol*. 2013 Nov 18;4:189. doi: 10.3389/fneur.2013.00189.
- Cadet, J. L., Bisagno, V., y Milroy, C. M. (2014). Neuropathology of substance use disorders. *Acta Neuropathologica*, 127(1), 91–107. doi:10.1007/s00401-013-1221-7

- Camps, M., Kelly, P.H., y Palacios, J.M. (1990). Autoradiographic localization of dopamine D 1 and D 2 receptors in the brain of several mammalian species. *J Neural Transm Gen Sect.* 1990;80(2):105-27.
- Cao, Y.-Q., Piedras-Rentería, E. S., Smith, G. B., Chen, G., Harata, N. C., y Tsien, R. W. (2004). Presynaptic Ca²⁺ channels compete for channel type-preferring slots in altered neurotransmission arising from Ca²⁺ channelopathy. *Neuron*, 43(3), 387–400. doi:10.1016/j.neuron.2004.07.014
- Carabelli, V., Marcantoni, A., Comunanza, V., y Carbone, E. (2007a). Fast exocytosis mediated by T- and L-type channels in chromaffin cells: distinct voltage-dependence but similar Ca²⁺ -dependence. *European Biophysics Journal : EBJ*, 36(7), 753–62. doi:10.1007/s00249-007-0138-2
- Carabelli, V., Marcantoni, A., Comunanza, V., de Luca, A., Díaz, J., Borges, R., y Carbone, E. (2007b). Chronic hypoxia up-regulates alpha1H T-type channels and low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 584(Pt 1), 149–65. doi:10.1113/jphysiol.2007.132274
- Carlezon, W. A., Mague, S. D., y Andersen, S. L. (2003). Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biological Psychiatry*, 54(12), 1330–7.
- Catterall, W. A. (1998). Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium*, 24(5-6), 307–23.
- Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 521–55. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.521
- Cavaccini, A., Yagüe, J.G., Errington, A.C., Crunelli, V., y Di Giovanni, G. (2012). Opposite effects of thalamic 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor activation on tonic GABA-A inhibition: implications for absence epilepsy. *Annual Meeting of Neuroscience Society, New Orleans, USA, P 138.103/B157.*
- Chait, L. D. (1994). Reinforcing and subjective effects of methylphenidate in humans. *Behavioural Pharmacology*, 5(3), 281–288.
- Challman, T. D., y Lipsky, J. J. (2000). Methylphenidate: its pharmacology and uses. *Mayo Clinic Proceedings*, 75(7), 711–21. doi:10.4065/75.7.711
- Clarke, A.R., Barry, R.J., McCarthy, R., Selikowitz, M., Clarke, D.C., y Croft, R.J. (2003). Effects of stimulant medications on children with attention-deficit/hyperactivity disorder and excessive beta activity in their EEG. *Clin Neurophysiol.* 2003 Sep;114(9):1729-37.
- Clemow, D. B., y Walker, D. J. (2014). The potential for misuse and abuse of medications in ADHD: a review. *Postgraduate Medicine*, 126(5), 64–81. doi:10.3810/pgm.2014.09.2801
- Conrad, L. C., Leonard, C. M., y Pfaff, D. W. (1974). Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *The Journal of Comparative Neurology*, 156(2), 179–205. doi:10.1002/cne.901560205
- Cope, D. W., Hughes, S. W., y Crunelli, V. (2005). GABA_A receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(50), 11553–63. doi:10.1523/JNEUROSCI.3362-05.2005

- Coulter, D. A., Huguenard, J. R., y Prince, D. A. (1989). Calcium currents in rat thalamocortical relay neurones: kinetic properties of the transient, low-threshold current. *The Journal of Physiology*, 414, 587–604.
- Craig, P. J., Beattie, R. E., Folly, E. A., Banerjee, M. D., Reeves, M. B., Priestley, J. V., ... Volsen, S. G. (1999). Distribution of the voltage-dependent calcium channel $\alpha 1G$ subunit mRNA and protein throughout the mature rat brain. *The European Journal of Neuroscience*, 11, 2949–2964.
- Crandall, S. R., Govindaiah, G., y Cox, C. L. (2010). Low-threshold Ca^{2+} current amplifies distal dendritic signaling in thalamic reticular neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(46), 15419–29. doi:10.1523/JNEUROSCI.3636-10.2010
- Crowley, N. A., Cody, P. A., Davis, M. I., Lovinger, D. M., y Mateo, Y. (2014). Chronic methylphenidate exposure during adolescence reduces striatal synaptic responses to ethanol. *The European Journal of Neuroscience*, 39(4), 548–56. doi:10.1111/ejn.12426

D

- D'Amato, R. J., Blue, M. E., Largent, B. L., Lynch, D. R., Ledbetter, D. J., Molliver, M. E., y Snyder, S. H. (1987). Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(12), 4322–6.
- Dahlström, A., y Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, suppl 232:1–55.
- De Biasi, S., Amadeo, A., Arcelli, P., Frassoni, C., y Spreafico, R. (1997). Postnatal development of GABA-immunoreactive terminals in the reticular and ventrobasal nuclei of the rat thalamus: a light and electron microscopic study. *Neuroscience*, 76(2), 503–15.
- De la Herrán-Arita, A. K., y García-García, F. (2013). Current and emerging options for the drug treatment of narcolepsy. *Drugs*, 73(16), 1771–81. doi:10.1007/s40265-013-0127-y
- del Castillo, J. y Katz, B. (1954). Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *J Physiol*. 1954 Jun 28;124(3):574-85.
- Degenhardt, L., y Hall, W. (2012). Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. *Lancet*, 379(9810), 55–70. doi:10.1016/S0140-6736(11)61138-0
- Deisz, R. A., Billard, J. M., y Zieglgänsberger, W. (1997). Presynaptic and postsynaptic GABAB receptors of neocortical neurons of the rat in vitro: differences in pharmacology and ionic mechanisms. *Synapse (New York, N.Y.)*, 25(1), 62–72. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(199701)25:1<62::AID-SYN8>3.0.CO;2-D
- Destexhe, A., Neubig, M., Ulrich, D., y Huguenard, J. (1998). Dendritic low-threshold calcium currents in thalamic relay cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(10), 3574–88.
- Devlin, R. J., y Henry, J. A. (2008). Clinical review: Major consequences of illicit drug consumption. *Critical Care (London, England)*, 12(1), 202. doi:10.1186/cc6166

Diagnosis and treatment of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). (n.d.). *NIH Consensus Statement*, 16(2), 1–37.

Dole, V. P., Nyswander, M. E., y Kreek, M. J. (1966). Narcotic blockade. *Archives of Internal Medicine*, 118(4), 304–9.

Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., ... MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science (New York, N.Y.)*, 280, 69–77. doi:10.1126/science.280.5360.69

Driscoll, H. E., Muraro, N. I., He, M., y Baines, R. A. (2013). Pumilio-2 regulates translation of Nav1.6 to mediate homeostasis of membrane excitability. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(23), 9644–54. doi:10.1523/JNEUROSCI.0921-13.2013

E

Eaton, S. A., y Salt, T. E. (1989). Modulatory effects of serotonin on excitatory amino acid responses and sensory synaptic transmission in the ventrobasal thalamus. *Neuroscience*, 33(2), 285–92.

Erlj, D., Acosta-García, J., Rojas-Márquez, M., González-Hernández, B., Escartín-Perez, E., Aceves, J., y Florán, B. (2012). Dopamine D4 receptor stimulation in GABAergic projections of the globus pallidus to the reticular thalamic nucleus and the substantia nigra reticulata of the rat decreases locomotor activity. *Neuropharmacology*, 62(2), 1111–8. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.11.001

F

Farr, O. M., Zhang, S., Hu, S., Matuskey, D., Abdelghany, O., Malison, R. T., y Li, C.-S. R. (2014). The effects of methylphenidate on resting-state striatal, thalamic and global functional connectivity in healthy adults. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 17(8), 1177–91. doi:10.1017/S1461145714000674

Federici, M., Geracitano, R., Bernardi, G., y Mercuri, N. B. (2005). Actions of methylphenidate on dopaminergic neurons of the ventral midbrain. *Biological Psychiatry*, 57(4), 361–5. doi:10.1016/j.biopsych.2004.11.030

Fedulova, S. A., Kostyuk, P. G., y Veselovsky, N. S. (1985). Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of Physiology*, 359, 431–446.

Findling, R. L., y Dogin, J. W. (1998). Psychopharmacology of ADHD: children and adolescents. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 59 Suppl 7, 42–9.

Firestone, P., Musten, L. M., Pisterman, S., Mercer, J., y Bennett, S. (1998). Short-term side effects of stimulant medication are increased in preschool children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a double-blind placebo-controlled study. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 8(1), 13–25.

Florán, B., Florán, L., Erlj, D., y Aceves, J. (2004). Activation of dopamine D4 receptors modulates [3H]GABA release in slices of the rat thalamic reticular nucleus. *Neuropharmacology*, 46(4), 497–503. doi:10.1016/j.neuropharm.2003.10.004

- Fraser, D. D., y MacVicar, B. A. (1991). Low-threshold transient calcium current in rat hippocampal lacunosum-moleculare interneurons: kinetics and modulation by neurotransmitters. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(9), 2812–20.
- Frère, S. G., Kuisle, M., y Lüthi, A. (2004). Regulation of recombinant and native hyperpolarization-activated cation channels. *Molecular Neurobiology*, 30(3), 279–305. doi:10.1385/MN:30:3:279
- Frère, S. G., y Lüthi, A. (2004). Pacemaker channels in mouse thalamocortical neurones are regulated by distinct pathways of cAMP synthesis. *The Journal of Physiology*, 554(Pt 1), 111–25. doi:10.1113/jphysiol.2003.050989
- Fritschy, J. M., y Mohler, H. (1995). GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *The Journal of Comparative Neurology*, 359(1), 154–94. doi:10.1002/cne.903590111
- Fujimiya, M., Kimura, H., y Maeda, T. (1986). Postnatal development of serotonin nerve fibers in the somatosensory cortex of mice studied by immunohistochemistry. *The Journal of Comparative Neurology*, 246(2), 191–201. doi:10.1002/cne.902460205
- ## G
- García-Cabezas, M. A., Martínez-Sánchez, P., Sánchez-González, M. A., Garzón, M., y Cavada, C. (2009). Dopamine innervation in the thalamus: monkey versus rat. *Cerebral Cortex*, 19(2), 424–34. doi:10.1093/cercor/bhn093
- García-Cabezas, M. A., Rico, B., Sánchez-González, M. A., y Cavada, C. (2007). Distribution of the dopamine innervation in the macaque and human thalamus. *NeuroImage*, 34(3), 965–84. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.07.032
- García-Rill, E., Kezunovic, N., Hyde, J., Simon, C., Beck, P., y Urbano, F. J. (2013). Coherence and frequency in the reticular activating system (RAS). *Sleep Medicine Reviews*, 17(3), 227–38. doi:10.1016/j.smrv.2012.06.002
- Gasca-Martinez, D., Hernandez, A., Sierra, A., Valdiosera, R., Anaya-Martinez, V., Floran, B., ... Aceves, J. (2010). Dopamine inhibits GABA transmission from the globus pallidus to the thalamic reticular nucleus via presynaptic D4 receptors. *Neuroscience*, 169(4), 1672–81. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.05.048
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., y Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4986), 1429–32.
- Gilmore, A., y Milne, R. (2001). Methylphenidate in children with hyperactivity: review and cost-utility analysis. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 10(2), 85–94. doi:10.1002/pds.564
- Glowinski, J., y Axelrod, J. (1966). Effects of drugs on the disposition of H-3-norepinephrine in the rat brain. *Pharmacological Reviews*, 18(1), 775–85.
- Goldstein, R. Z., Leskovjan, A. C., Hoff, A. L., Hitzemann, R., Bashan, F., Khalsa, S. S., ... Volkow, N. D. (2004). Severity of neuropsychological impairment in cocaine and alcohol addiction: association with metabolism in the prefrontal cortex. *Neuropsychologia*, 42(11), 1447–58. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2004.04.002

- Gonzalo-Ruiz, A., Lieberman, A. R., y Sanz-Anquela, J. M. (1995). Organization of serotonergic projections from the raphé nuclei to the anterior thalamic nuclei in the rat: a combined retrograde tracing and 5-HT immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 8(2), 103–15.
- Govindaiah, G., Wang, Y., y Cox, C. L. (2010). Dopamine enhances the excitability of somatosensory thalamocortical neurons. *Neuroscience*, 170(4), 981–91. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.043
- Groenewegen, H. J. (1988). Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience*, 24(2), 379–431.
- ## H
- Han, D. D., y Gu, H. H. (2006). Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacology*, 6, 6. doi:10.1186/1471-2210-6-6
- Hanson, G. R., Jensen, M., Johnson, M., y White, H. S. (1999). Distinct features of seizures induced by cocaine and amphetamine analogs. *European Journal of Pharmacology*, 377(2-3), 167–73.
- Harkins, A. B., Cahill, A. L., Powers, J. F., Tischler, A. S., y Fox, A. P. (2003). Expression of recombinant calcium channels support secretion in a mouse pheochromocytoma cell line. *Journal of Neurophysiology*, 90(4), 2325–33. doi:10.1152/jn.00425.2003
- Hirai, T., y Jones, E. G. (1989). A new parcellation of the human thalamus on the basis of histochemical staining. *Brain Research Reviews*, 14(1), 1–34. doi:10.1016/0165-0173(89)90007-6
- Hornykiewicz, O. (1966). Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacological Reviews*, 18(2), 925–64.
- Hosford, D. A., Clark, S., Cao, Z., Wilson, W. A., Lin, F. H., Morrisett, R. A., y Huin, A. (1992). The role of GABAB receptor activation in absence seizures of lethargic (lh/lh) mice. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5068), 398–401.
- Huang, Q., Zhou, D., Chase, K., Gusella, J.F., Aronin, N., y DiFiglia, M. (1992). Immunohistochemical localization of the D1 dopamine receptor in rat brain reveals its axonal transport, pre- and postsynaptic localization, and prevalence in the basal ganglia, limbic system, and thalamic reticular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 15;89(24):11988-92.
- Huang, L., Keyser, B. M., Tagmose, T. M., Hansen, J. B., Taylor, J. T., Zhuang, H., ... Li, M. (2004). NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(1), 193–9. doi:10.1124/jpet.103.060814
- Huguenard, J. R., y McCormick, D. A. (1992). Simulation of the currents involved in rhythmic oscillations in thalamic relay neurons. *Journal of Neurophysiology*, 68(4), 1373–83.
- Huguenard, J. R., y Prince, D. A. (1992). A novel T-type current underlies prolonged Ca(2+)-dependent burst firing in GABAergic neurons of rat thalamic reticular nucleus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(10), 3804–17.

I

Inchauspe, C. G., Martini, F. J., Forsythe, I. D., y Uchitel, O. D. (2004). Functional compensation of P/Q by N-type channels blocks short-term plasticity at the calyx of held presynaptic terminal. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(46), 10379–83. doi:10.1523/JNEUROSCI.2104-04.2004

Iwasaki, S., Momiyama, A., Uchitel, O. D., y Takahashi, T. (2000). Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(1), 59–65.

J

Jackson, D. M., y Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, 64(2), 291–370.

Jacobs, B. L., y Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, 72(1), 165–229.

Jahnsen, H., y Llinás, R. (1984a). Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an in vitro study. *The Journal of Physiology*, 349, 205–26.

Jahnsen, H., y Llinás, R. (1984b). Ionic basis for the electro-responsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones in vitro. *The Journal of Physiology*, 349, 227–47.

Jan, L. Y., y Jan, Y. N. (1990). A superfamily of ion channels. *Nature*, 345(6277), 672. doi:10.1038/345672a0

Jasinski, D. R. (2000). An evaluation of the abuse potential of modafinil using methylphenidate as a reference. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 14(1), 53–60.

Jeanmonod, D., Schulman, J., Ramirez, R., Cancro, R., Lanz, M., Morel, A., ... Llinás, R. (2003). Neuropsychiatric thalamocortical dysrhythmia: surgical implications. *Neurosurgery Clinics of North America*, 14(2), 251–65.

Jia, F., Pignataro, L., Schofield, C. M., Yue, M., Harrison, N. L., y Goldstein, P. A. (2005). An extrasynaptic GABAA receptor mediates tonic inhibition in thalamic VB neurons. *Journal of Neurophysiology*, 94(6), 4491–501. doi:10.1152/jn.00421.2005

Jiménez-González, C., Pirttimaki, T., Cope, D. W., y Parri, H. R. (2011). Non-neuronal, slow GABA signalling in the ventrobasal thalamus targets δ -subunit-containing GABA(A) receptors. *The European Journal of Neuroscience*, 33(8), 1471–82. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07645.x

Joel, D., y Weiner, I. (2000). The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience*, 96(3), 451–74.

Jones, E. G. (2007). *The Thalamus* (p. 1708). Cambridge University Press.

Jun, K., Piedras-Rentería, E. S., Smith, S. M., Wheeler, D. B., Lee, S. B., Lee, T. G., ... Shin, H. S. (1999). Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive

ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15245–50.

K

- Kasai, H., Aosaki, T., y Fukuda, J. (1987). Presynaptic Ca-antagonist omega-conotoxin irreversibly blocks N-type Ca-channels in chick sensory neurons. *Neuroscience Research*, 4, 228–235. doi:10.1016/S0921-8696(87)80021-X
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., ... Bettler, B. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*, 396(6712), 683–7. doi:10.1038/25360
- Kerr, C. W., y Bishop, G. A. (1991). Topographical organization in the origin of serotonergic projections to different regions of the cat cerebellar cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 304(3), 502–15. doi:10.1002/cne.903040313
- Kerr, L. M., y Yoshikami, D. (1984). A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature*, 308(5956), 282–4.
- Khan, Z. U., Gutiérrez, A., Martín, R., Peñafiel, A., Rivera, A., y De La Calle, A. (1998). Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 402(3), 353–71.
- Khan, Z. U., Koulen, P., Rubinstein, M., Grandy, D. K., y Goldman-Rakic, P. S. (2001). An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1964–9. doi:10.1073/pnas.98.4.1964
- Kiss, Z. H., Tsoukatos, J., Tasker, R. R., Davis, K. D., y Dostrovsky, J. O. (1995). Sleeping cells in the human thalamus. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 65(1-4), 125–9.
- Koob, G. F. (1999). The role of the striatopallidal and extended amygdala systems in drug addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, 445–60.
- Koob, G. F., y Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–38. doi:10.1038/npp.2009.110
- Kraus, R. L., Li, Y., Gregan, Y., Gotter, A. L., Uebele, V. N., Fox, S. V., ... Renger, J. J. (2010). In vitro characterization of T-type calcium channel antagonist TTA-A2 and in vivo effects on arousal in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(2), 409–17. doi:10.1124/jpet.110.171058
- Kreek, M. J. (2001). Drug addictions. Molecular and cellular endpoints. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 937, 27–49.
- Kuczenski, R., y Segal, D. S. (1997). Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *Journal of Neurochemistry*, 68(5), 2032–7.

Kump, D. F., Matulka, R. a, Edinboro, L. E., Poklis, a, y Holsapple, M. P. (1994). Disposition of cocaine and norcocaine in blood and tissues of B6C3F1 mice. *Journal of Analytical Toxicology*, 18(6), 342–5.

Kuner, R., Köhr, G., Grünewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A., y Kornau, H. C. (1999). Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5398), 74–7.

L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–5.

Le Moal, M., y Simon, H. (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiological Reviews*, 71(1), 155–234.

Lee, K. H., y McCormick, D. A. (1996). Abolition of spindle oscillations by serotonin and norepinephrine in the ferret lateral geniculate and perigeniculate nuclei in vitro. *Neuron*, 17(2), 309–21.

Li, Q.-H., Nakadate, K., Tanaka-Nakadate, S., Nakatsuka, D., Cui, Y., y Watanabe, Y. (2004). Unique expression patterns of 5-HT2A and 5-HT2C receptors in the rat brain during postnatal development: Western blot and immunohistochemical analyses. *The Journal of Comparative Neurology*, 469(1), 128–40. doi:10.1002/cne.11004

Liao, Y.-F., Tsai, M.-L., Chen, C.-C., y Yen, C.-T. (2011). Involvement of the Cav3.2 T-type calcium channel in thalamic neuron discharge patterns. *Molecular Pain*, 7, 43. doi:10.1186/1744-8069-7-43

Liu, H., De Waard, M., Scott, V. E., Gurnett, C. A., Lennon, V. A., y Campbell, K. P. (1996). Identification of three subunits of the high affinity omega-conotoxin MVIIC-sensitive Ca²⁺ channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(23), 13804–10.

Liu, Z., Vergnes, M., Depaulis, A., y Marescaux, C. (1992). Involvement of intrathalamic GABAB neurotransmission in the control of absence seizures in the rat. *Neuroscience*, 48(1), 87–93.

Llinás, R., y Geijo-Barrientos, E. (1988). In vitro studies of mammalian thalamic and reticularis thalami neurons. In M. Bentivoglio & R. Spreafico (Eds.), *Cellular Thalamic Mechanisms* (pp. 23–33). Amsterdam: Elsevier B.V.

Llinas, R. R., Leznik, E., y Urbano, F. J. (2002). Temporal binding via cortical coincidence detection of specific and nonspecific thalamocortical inputs: a voltage-dependent dye-imaging study in mouse brain slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 449–54. doi:10.1073/pnas.012604899

Llinás, R. R., Ribary, U., Jeanmonod, D., Kronberg, E., y Mitra, P. P. (1999). Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15222–7.

Llinás, R., Ribary, U., Contreras, D., y Pedroarena, C. (1998). The neuronal basis for consciousness. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 353(1377), 1841–9. doi:10.1098/rstb.1998.0336

- Llinás, R., Sugimori, M., Lin, J. W., y Cherksey, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(5), 1689–93.
- Llinás, R., Urbano, F. J., Leznik, E., Ramírez, R. R., y van Marle, H. J. F. (2005). Rhythmic and dysrhythmic thalamocortical dynamics: GABA systems and the edge effect. *Trends in Neurosciences*, 28(6), 325–33. doi:10.1016/j.tins.2005.04.006
- Logan, J., Fowler, J. S., Volkow, N. D., Wolf, A. P., Dewey, S. L., Schlyer, D. J., ... Gatley, S. J. (1990). Graphical analysis of reversible radioligand binding from time-activity measurements applied to [N-11C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 10(5), 740–7. doi:10.1038/jcbfm.1990.127
- Luo, M., y Perkel, D. J. (1999). A GABAergic, strongly inhibitory projection to a thalamic nucleus in the zebra finch song system. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(15), 6700–11.
- Lüthi, A., y McCormick, D. A. (1999). Modulation of a pacemaker current through Ca(2+)-induced stimulation of cAMP production. *Nature Neuroscience*, 2(7), 634–41. doi:10.1038/10189
- Lüthi, A., Bal, T., y McCormick, D. A. (1998). Periodicity of thalamic spindle waves is abolished by ZD7288, a blocker of I_h. *Journal of Neurophysiology*, 79(6), 3284–9.

M

- MacDonald, R. L., y Olsen, R. W. (1994). GABA_A receptor channels. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 569–602. doi:10.1146/annurev.ne.17.030194.003033
- Manjanatha, M. G., Shelton, S. D., Dobrovolsky, V. N., Shaddock, J. G., McGarrity, L. G., Doerge, D. R., ... Morris, S. M. (2008). Pharmacokinetics, dose-range, and mutagenicity studies of methylphenidate hydrochloride in B6C3F1 mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49(8), 585–93. doi:10.1002/em.20407
- Marescaux, C., Vergnes, M., Liu, Z., Depaulis, A., y Bernasconi, R. (1992). GABA_B receptor involvement in the control of genetic absence seizures in rats. *Epilepsy Research. Supplement*, 9, 131–8; discussion 138–9.
- Martínez-Raga, J., Knecht, C., y Cepeda, S. (2008). Modafinil: a useful medication for cocaine addiction? Review of the evidence from neuropharmacological, experimental and clinical studies. *Current Drug Abuse Reviews*, 1(2), 213–21.
- Martin-Moutot, N., Charvin, N., Leveque, C., Sato, K., Nishiki, T., Kozaki, S., ... Seagar, M. (1996). Interaction of SNARE complexes with P/Q-type calcium channels in rat cerebellar synaptosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6567–70.
- Martin-Moutot, N., Leveque, C., Sato, K., Kato, R., Takahashi, M., y Seagar, M. (1995). Properties of omega conotoxin MVIIC receptors associated with alpha 1A calcium channel subunits in rat brain. *FEBS Letters*, 366(1), 21–5.

- Mash, D. C., Pablo, J., Ouyang, Q., Hearn, W. L., y Izenwasser, S. (2002). Dopamine transport function is elevated in cocaine users. *Journal of Neurochemistry*, *81*(2), 292–300.
- Mash, D. C., Staley, J. K., Izenwasser, S., Basile, M., y Rutenber, A. J. (2000). Serotonin transporters upregulate with chronic cocaine use. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *20*(3-4), 271–80.
- McCormick, D. A., y Bal, T. (1997). Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annual Review of Neuroscience*, *20*, 185–215. doi:10.1146/annurev.neuro.20.1.185
- McCormick, D. A., y Feuser, H. R. (1990). Functional implications of burst firing and single spike activity in lateral geniculate relay neurons. *Neuroscience*, *39*(1), 103–13.
- McCormick, D. A., y Pape, H. C. (1990a). Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones. *The Journal of Physiology*, *431*, 319–42.
- McCormick, D. A., y Pape, H. C. (1990b). Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *The Journal of Physiology*, *431*, 291–318.
- McCormick, D., y Wang, Z. (1991). Serotonin and noradrenaline excite GABAergic neurones of the guinea-pig and cat nucleus reticularis thalami. *The Journal of Physiology*, 235–255.
- Mijnster, M.J., Isovich, E., Flügge, G., y Fuchs, E. (1999). Localization of dopamine receptors in the tree shrew brain using [3H]-SCH23390 and [125I]-epidepride. *Brain Res.* 1999 Sep 11;841(1-2):101-13.
- Millan, M. J., Marin, P., Bockaert, J., y Mannoury la Cour, C. (2008). Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends in Pharmacological Sciences*, *29*(9), 454–64. doi:10.1016/j.tips.2008.06.007
- Mintz, I. M. (1994). Block of Ca channels in rat central neurons by the spider toxin omega-Aga-IIIa. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *14*, 2844–2853.
- Minzenberg, M. J., y Carter, C. S. (2008). Modafinil: a review of neurochemical actions and effects on cognition. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *33*(7), 1477–502. doi:10.1038/sj.npp.1301534
- Misgeld, U., Bijak, M., y Jarolimek, W. (1995). A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, *46*(4), 423–62.
- Missale, C., y Nash, S. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological ...*, *78*(1), 189–226.
- Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F. J., Miyoshi, K., y Ogawa, N. (2004). Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain Research*, *1029*(1), 120–3. doi:10.1016/j.brainres.2004.09.014
- Monckton, J. E., y McCormick, D. A. (2002). Neuromodulatory role of serotonin in the ferret thalamus. *Journal of Neurophysiology*, *87*(4), 2124–36. doi:10.1152/jn.00650.2001

- Moore, R. Y., y Bloom, F. E. (1978). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annual Review of Neuroscience*, 1, 129–69. doi:10.1146/annurev.ne.01.030178.001021
- Moore, R. Y., Halaris, A. E., y Jones, B. E. (1978). Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *The Journal of Comparative Neurology*, 180(3), 417–38. doi:10.1002/cne.901800302
- Morin, L. P., y Meyer-Bernstein, E. L. (1999). The ascending serotonergic system in the hamster: comparison with projections of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuroscience*, 91(1), 81–105.
- Morton, W. A., y Stockton, G. G. (2000). Methylphenidate Abuse and Psychiatric Side Effects. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*, 2(5), 159–164.
- Mott, T. F., Leach, L., y Johnson, L. (2004). Clinical inquiries. Is methylphenidate useful for treating adolescents with ADHD? *The Journal of Family Practice*, 53(8), 659–61.
- Mrzljak, L., Bergson, C., Pappy, M., Huff, R., Levenson, R., y Goldman-Rakic, P.S. (1996). Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature*. 1996 May 16;381(6579):245-8.
- Mueller, S., Costa, A., Keeser, D., Pogarell, O., Berman, A., Coates, U., ... Meindl, T. (2014). The effects of methylphenidate on whole brain intrinsic functional connectivity. *Human Brain Mapping*, 35(11), 5379–88. doi:10.1002/hbm.22557
- Munsch, T., Freichel, M., Flockerzi, V., y Pape, H.-C. (2003). Contribution of transient receptor potential channels to the control of GABA release from dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 16065–70. doi:10.1073/pnas.2535311100

N

Naciones Unidas (2011). *World drug report 2011*.

Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X. H., Hopkins, W., ... Miljanich, G. (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry*, 37, 15353–15362. doi:10.1021/bi981255g

NIDA (2010). *Research Report Series. Cocaine*. Descargado de <http://www.drugabuse.gov/sites/default/files/methrrs.pdf>

NIDA. (2013). *Research Report Series. Methamphetamine*. Descargado de http://www.drugabuse.gov/sites/default/files/methrrs_web.pdf

Nnadi, C. U., Mimiko, O. A., McCurtis, H. L., y Cadet, J. L. (2005). Neuropsychiatric effects of cocaine use disorders. *Journal of the National Medical Association*, 97(11), 1504–15.

O

O'Brien, C. P. (1996). Drug addiction and drug abuse. In J. Hardman, L. Limbird, P. Molinoff, & E. Al. (Eds.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (9th ed., p. 571). Nueva York, NY: McGraw-Hill.

P

- Pagani, R., Song, M., McEnery, M., Qin, N., Tsien, R. W., Toro, L., ... Uchitel, O. D. (2004). Differential expression of alpha 1 and beta subunits of voltage dependent Ca²⁺ channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca²⁺ channel knockout mouse. *Neuroscience*, 123(1), 75–85.
- Papadopoulos, G. C., y Parnavelas, J. G. (1990). Distribution and synaptic organization of dopaminergic axons in the lateral geniculate nucleus of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 294(3), 356–61. doi:10.1002/cne.902940305
- Paré, D., Dossi, R. C., y Steriade, M. (1991). Three types of inhibitory postsynaptic potentials generated by interneurons in the anterior thalamic complex of cat. *Journal of Neurophysiology*, 66(4), 1190–204.
- Paxinos G., y Franklin K.B.J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2^a ed. Academic Press.
- Pedroarena, C., y Llinás, R. (1997). Dendritic calcium conductances generate high-frequency oscillation in thalamocortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(2), 724–8.
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological Reviews*, 83(1), 117–61. doi:10.1152/physrev.00018.2002
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Yang J, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, y Lee J-H. (1998). Molecular characterization of T-type calcium channels. En: *Low Voltage-activated T-type Calcium Channels*. Editores: Tsien RW, Clozel J-P, y Nargeot J. Chester, Reino Unido: Adis International, 1998, p. 290–305.
- Perret, G., Schluger, J.H., Unterwald, E.M., Kreuter, J., Ho, A., y Kreek, M.J. (1998). Downregulation of 5-HT_{1A} receptors in rat hypothalamus and dentate gyrus after "binge" pattern cocaine administration. *Synapse*. 1998 Oct;30(2):166-71.
- Peschanski, M., y Besson, J. M. (1984). Diencephalic connections of the raphé nuclei of the rat brainstem: an anatomical study with reference to the somatosensory system. *The Journal of Comparative Neurology*, 224(4), 509–34. doi:10.1002/cne.902240404
- Pietrobon, D. (2005). Function and dysfunction of synaptic calcium channels: insights from mouse models. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(3), 257–65. doi:10.1016/j.conb.2005.05.010
- Pinault, D. (2004). The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004 Aug;46(1):1-31.
- Pinault, D., y Deschênes, M. (1992). Voltage-dependent 40-Hz oscillations in rat reticular thalamic neurons in vivo. *Neuroscience*, 51(2), 245–58.

R

- Rappley, M. D. (1997). Safety issues in the use of methylphenidate. An American perspective. *Drug Safety*, 17(3), 143–8.
- Rhodes, P. A., y Llinás, R. (2005). A model of thalamocortical relay cells. *The Journal of Physiology*, 565(Pt 3), 765–81. doi:10.1113/jphysiol.2004.070888

- Ritz, M. C., Lamb, R. J., Goldberg, S. R., y Kuhar, M. J. (1987). Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4819), 1219–23.
- Rodríguez, J. J., Noristani, H. N., Hoover, W. B., Linley, S. B., y Vertes, R. P. (2011). *Serotonergic projections and serotonin receptor expression in the reticular nucleus of the thalamus in the rat. Synapse (New York, N.Y.)* (Vol. 65, pp. 919–28). doi:10.1002/syn.20920
- Ross, S. B., y Renyi, A. L. (1969). Inhibition of the uptake of tritiated 5-hydroxytryptamine in brain tissue. *European Journal of Pharmacology*, 7(3), 270–7.
- Rovó, Z., Mátyás, F., Barthó, P., Slézia, A., Lecci, S., Pellegrini, C., Astori, S., Dávid, C., Hangya, B., Lüthi, A., Acsády, L. (2014). Phasic, nonsynaptic GABA-A receptor-mediated inhibition entrains thalamocortical oscillations. *J Neurosci*. 2014 May 21;34(21):7137-47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4386-13.2014.
- Rowe, D. L., Robinson, P. A., y Gordon, E. (2005). Stimulant drug action in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): inference of neurophysiological mechanisms via quantitative modelling. *Clinical Neurophysiology : Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 116(2), 324–35. doi:10.1016/j.clinph.2004.08.001
- Rutter, J. J., Baumann, M. H., y Waterhouse, B. D. (1998). Systemically administered cocaine alters stimulus-evoked responses of thalamic somatosensory neurons to perithreshold vibrissae stimulation. *Brain Research*, 798(1-2), 7–17.
- ## S
- Sadasivan, S., Pond, B.B., Pani, A.K., Qu, C., Jiao, Y., y Smeyne, R.J. (2012). Methylphenidate exposure induces dopamine neuron loss and activation of microglia in the basal ganglia of mice. *PLoS One*. 2012;7(3):e33693. doi: 10.1371/journal.pone.0033693. Epub 2012 Mar 21. Erratum in: *PLoS One*.2012;7(5): doi/10.1371/annotation/c76da2c1-ccb8-4797-94c1-359d3ceceeda.
- Sánchez-González, M. A., García-Cabezas, M. A., Rico, B., y Cavada, C. (2005). The primate thalamus is a key target for brain dopamine. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(26), 6076–83. doi:10.1523/JNEUROSCI.0968-05.2005
- Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G.P., Tibbs, GR., y Siegelbaum, S.A. (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci*. 2000 Jul 15;20(14):5264-75.
- Sasaki, S., Huda, K., Inoue, T., Miyata, M., e Imoto, K. (2006). Impaired feedforward inhibition of the thalamocortical projection in epileptic Ca²⁺ channel mutant mice, tottering. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(11), 3056–65. doi:10.1523/JNEUROSCI.5422-05.2006
- Schramm-Sapyta, N. L., Pratt, A. R., y Winder, D. G. (2004). Effects of periadolescent versus adult cocaine exposure on cocaine conditioned place preference and motor sensitization in mice. *Psychopharmacology*, 173(1-2), 41–8. doi:10.1007/s00213-003-1696-3
- Segal, D. S., y Kuczenski, R. (1999). Escalating dose-binge treatment with methylphenidate: role of serotonin in the emergent behavioral profile. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 291(1), 19–30.

- Senft, S.L., y Woolsey, T.A. (1991). Growth of thalamic afferents into mouse barrel cortex. *Cereb Cortex*, 1991 Jul-Aug;1(4):308-35.
- Shearer, J., Darke, S., Rodgers, C., Slade, T., van Beek, I., Lewis, J., ... Wodak, A. (2009). A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil (200 mg/day) for methamphetamine dependence. *Addiction (Abingdon, England)*, 104(2), 224-33. doi:10.1111/j.1360-0443.2008.02437.x
- Shinnar, S., Maciewicz, R. J., y Shofer, R. J. (1975). A raphe projection to cat cerebellar cortex. *Brain Research*, 97(1), 139-43.
- Shoji, S., Simms, D., Yamada, K., y Gallagher, J. P. (1998). Cocaine administered in vitro to brain slices from rats treated with cocaine chronically in vivo results in a gamma-aminobutyric acid receptor-mediated hyperpolarization recorded from the dorsolateral septum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 286(1), 509-18.
- Shosaku, A., Kayama, Y., Sumitomo, I., Sugitani, M., e Iwama, K. (1989). Analysis of recurrent inhibitory circuit in rat thalamus: neurophysiology of the thalamic reticular nucleus. *Progress in Neurobiology*, 32(2), 77-102.
- Singer, W. (1998). Consciousness and the structure of neuronal representations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 353(1377), 1829-40. doi:10.1098/rstb.1998.0335
- Soltesz, I., y Crunelli, V. (1992). GABAA and pre- and post-synaptic GABAB receptor-mediated responses in the lateral geniculate nucleus. *Progress in Brain Research*, 90, 151-69.
- Soltesz, I., Haby, M., Leresche, N., y Crunelli, V. (1988). The GABAB antagonist phaclofen inhibits the late K⁺-dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurones. *Brain Research*, 448(2), 351-4.
- Song, I., Kim, D., Choi, S., Sun, M., Kim, Y., y Shin, H.-S. (2004). Role of the alpha1G T-type calcium channel in spontaneous absence seizures in mutant mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(22), 5249-57. doi:10.1523/JNEUROSCI.5546-03.2004
- Spangler, R., Unterwald, E. M., y Kreek, M. J. (1993). "Binge" cocaine administration induces a sustained increase of prodynorphin mRNA in rat caudate-putamen. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 19(4), 323-7.
- Steinbusch, H. W. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6(4), 557-618.
- Stell, B. M., y Mody, I. (2002). Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(10), RC223. doi:20026399
- Steriade, M. (2001). Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *Journal of Neurophysiology*, 86(1), 1-39.
- Steriade, M. (2005). Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. *Trends in Neurosciences*, 28(6), 317-24. doi:10.1016/j.tins.2005.03.007

- Steriade, M., Domich, L., y Oakson, G. (1986). Reticularis thalami neurons revisited: activity changes during shifts in states of vigilance. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 6(1), 68–81.
- Steriade, M., y Llinás, R. R. (1988). The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiological Reviews*, 68(3), 649–742.
- Steriade, M., y Timofeev, I. (2003). Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron*, 37(4), 563–76.
- Steriade, M., y Wyzinski, P. (1972). Cortically elicited activities in thalamic reticularis neurons. *Brain Research*, 42(2), 514–20.
- Sun, Y.-G., Wu, C.-S., Renger, J. J., Uebele, V. N., Lu, H.-C., y Beierlein, M. (2012). GABAergic synaptic transmission triggers action potentials in thalamic reticular nucleus neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(23), 7782–90. doi:10.1523/JNEUROSCI.0839-12.2012
- Swanson, L. W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin*, 9(1-6), 321–53.
- ## T
- Talley, E. M., Cribbs, L. L., Lee, J. H., Daud, A., Perez-Reyes, E., y Bayliss, D. A. (1999). Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19, 1895–1911.
- Tannenbaum, J. (2012). The Promise and Peril of the Pharmacological Enhancer Modafinil. *Bioethics*. doi:10.1111/bioe.12008
- Tomasi, D., Goldstein, R. Z., Telang, F., Maloney, T., Alia-Klein, N., Caparelli, E. C., y Volkow, N. D. (2007). Thalamo-cortical dysfunction in cocaine abusers: implications in attention and perception. *Psychiatry Research*, 155(3), 189–201. doi:10.1016/j.psychresns.2007.03.002
- Tringham, E., Powell, K. L., Cain, S. M., Kuplast, K., Mezeyova, J., Weerapura, M., ... Snutch, T. P. (2012). T-type calcium channel blockers that attenuate thalamic burst firing and suppress absence seizures. *Science Translational Medicine*, 4(121), 121ra19. doi:10.1126/scitranslmed.3003120
- Tritsch, N. X., y Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron*, 76(1), 33–50. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.023
- Tsakiridou, E., Bertollini, L., de Curtis, M., Avanzini, G., y Pape, H. C. (1995). Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(4), 3110–7.
- Tsoukatos, J., Kiss, Z. H., Davis, K. D., Tasker, R. R., y Dostrovsky, J. O. (1997). Patterns of neuronal firing in the human lateral thalamus during sleep and wakefulness. *Experimental Brain Research*, 113(2), 273–82.

U

- Uchitel, O. D., Protti, D. A., Sanchez, V., Cherksey, B. D., Sugimori, M., y Llinás, R. (1992). P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8), 3330–3.
- Ungerstedt, U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 367, 1–48.
- Urbano, F. J., Bisagno, V., Wikinski, S. I., Uchitel, O. D., y Llinás, R. R. (2009). Cocaine acute “binge” administration results in altered thalamocortical interactions in mice. *Biological Psychiatry*, 66(8), 769–76. doi:10.1016/j.biopsych.2009.04.026
- Urbano, F. J., Kezunovic, N., Hyde, J., Simon, C., Beck, P., y Garcia-Rill, E. (2012). Gamma band activity in the reticular activating system. *Frontiers in Neurology*, 3, 6. doi:10.3389/fneur.2012.00006
- Urbano, F. J., Piedras-Rentería, E. S., Jun, K., Shin, H.-S., Uchitel, O. D., y Tsien, R. W. (2003). Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), 3491–6. doi:10.1073/pnas.0437991100

V

- Van der Werf, Y. D., Witter, M. P., y Groenewegen, H. J. (2002). The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 39(2-3), 107–40.
- Vergnes, M., Boehrer, A., Simler, S., Bernasconi, R., y Marescaux, C. (1997). Opposite effects of GABAB receptor antagonists on absences and convulsive seizures. *European Journal of Pharmacology*, 332(3), 245–55.
- Vergnes, M., Marescaux, C., Micheletti, G., Depaulis, A., Rumbach, L., y Warter, J. M. (1984). Enhancement of spike and wave discharges by GABAmimetic drugs in rats with spontaneous petit-mal-like epilepsy. *Neuroscience Letters*, 44(1), 91–4.
- Vertes, R. P. (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(4), 643–68. doi:10.1002/cne.903130409
- Vertes, R. P., Fortin, W. J., & Crane, A. M. (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 407(4), 555–82.
- Vertes, R. P., y Martin, G. F. (1988). Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 275(4), 511–41. doi:10.1002/cne.902750404
- Volkow, N. D., Ding, Y. S., Fowler, J. S., Wang, G. J., Logan, J., Gatley, J. S., ... Hitzemann, R. (1995). Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. *Archives of General Psychiatry*, 52(6), 456–63.
- Volkow, N. D., e Insel, T. R. (2003). What are the long-term effects of methylphenidate treatment? *Biological Psychiatry*, 54(12), 1307–9.

- Volkow, N. D., y Li, T.-K. (2004). Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(12), 963–70. doi:10.1038/nrn1539
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Gatley, S. J., Logan, J., Ding, Y. S., ... Pappas, N. (1998). Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. *The American Journal of Psychiatry*, 155(10), 1325–31.
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., y Tomasi, D. (2012). Addiction circuitry in the human brain. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, 321–36. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134625
- ## W
- Waldmeier, P. C., Wicki, P., Feldtrauer, J. J., Mickel, S. J., Bittiger, H., y Baumann, P. A. (1994). GABA and glutamate release affected by GABAB receptor antagonists with similar potency: no evidence for pharmacologically different presynaptic receptors. *British Journal of Pharmacology*, 113(4), 1515–21.
- Walker, D., y De Waard, M. (1998). Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. *Trends in Neurosciences*, 21(4), 148–54.
- Warner, E. A. (1993). Cocaine abuse. *Annals of Internal Medicine*, 119(3), 226–35.
- Weiner, D. M., Levey, A. I., Sunahara, R. K., Niznik, H. B., O'Dowd, B. F., Seeman, P., y Brann, M. R. (1991). D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), 1859–63.
- Weisstaub, N. V., Zhou, M., Lira, A., Lambe, E., González-Maeso, J., Hornung, J.-P., ... Gingrich, J. A. (2006). Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5786), 536–40. doi:10.1126/science.1123432
- Williams, S. R., y Stuart, G. J. (2000). Action potential backpropagation and somato-dendritic distribution of ion channels in thalamocortical neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(4), 1307–17.
- Wilson, M. C., Bedford, J. A., Buelke, J., y Kibbe, A. H. (1976). Acute pharmacological activity of intravenous cocaine in the rhesus monkey. *Psychopharmacology Communications*, 2(3), 251–61.
- Wisden, W., Laurie, D. J., Monyer, H., y Seeburg, P. H. (1992). The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(3), 1040–62.
- Wise, R. A., y Bozarth, M. A. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological Review*, 94(4), 469–92.
- ## Y
- Yagüe, J. G., Cavaccini, A., Errington, A. C., Crunelli, V., y Di Giovanni, G. (2013). Dopaminergic modulation of tonic but not phasic GABAA-receptor-mediated current in the ventrobasal thalamus of Wistar and GAERS rats. *Experimental Neurology*, 247, 1–7. doi:10.1016/j.expneurol.2013.03.023

Yue, B. W., & Huguenard, J. R. (2001). The role of H-current in regulating strength and frequency of thalamic network oscillations. *Thalamus & Related Systems*, 1(2), 95–103. doi:10.1016/S1472-9288(01)00009-7

Z

Zhang, S. J., Huguenard, J. R., y Prince, D. A. (1997). GABAA receptor-mediated Cl⁻ currents in rat thalamic reticular and relay neurons. *Journal of Neurophysiology*, 78(5), 2280–6.

Zhang, Z.-W., Zak, J. D., y Liu, H. (2010). MeCP2 is required for normal development of GABAergic circuits in the thalamus. *Journal of Neurophysiology*, 103(5), 2470–81. doi:10.1152/jn.00601.2009