Explicación Resumida del Método

Primero es importante destacar que el protocolo de investigación se dividió en dos experimentos:

* Uno para los análisis conductuales de tolerancia a LSD
* Otro para los análisis de autoradiografía

-------

1. **Análisis Conductuales**

Se utiliza un procedimiento de discriminación para ver sí la administración de LSD crónica produce alteraciones (disminución de respuestas correctas) de la respuesta discriminatoria hacia LSD en las ratas, lo que es un modelo animal de tolerancia a una droga.

Algo así como sí yo diera leche de soya o agua, por varias semanas a un grupo de sujetos y les enseñara a emitir una respuesta en relación a lo que les doy de beber. (Si la soya fuera adictiva y generara tolerancia.. que puede ser?) supondría yo que después de una administración crónica, cuando les vuelva a presentar leche de soya (en una cantidad más reducida, digamos una cucharada cuando todo el tiempo les he dado un vaso completo) esperaría que les fuera difícil discriminar que les di, si agua o leche de soya y entonces presentaran una disminución en respuestas correctas…. En fin… algo así.

El procedimiento para realizar todo este show se divide en varios pasos, que son los siguientes:

*-Parte de* ***entrenamiento*** *para el análisis conductual.*

1.- Moldeamiento

Se busca solamente moldear la respuesta de presionar la palanca (respuesta que pues no es normal que una rata presente así porque sí) se usaron 60 ratas y un programa de Razón Fija 1 con sesiones de 20 minutos.

2.- Cambio de Programa/Contingencia

Cuando la respuesta de palanquear se volvió “estable”, se hizo un cambio de contingencia para “acostumbrar” a la rata a un programa de Intervalo Variable (porque hasta ahora ha estado sobre uno de Razón Fija). En esta parte aún se administran reforzadores por cada respuesta correcta. Se utiliza un programa de IV15s con TO15s. Aquí aun no se busca establecer ninguna discriminación sino solo estabilizar las respuestas bajo un programa de intervalo variable.

3.- Discriminación

Ahora sí, en esta parte se busca entrenar a las ratas en un procedimiento de discriminación. Se utiliza un programa de Intervalo Variable 30s y el procedimiento es más o menos así:

1. Se tienen dos palancas a las que se les asigna para un 50% de los animales (30 ratas) que la izquierda sea “LSD correct” y la derecha “Saline correct”, para el otro 50% (las otras 30 ratas) se invierte las condiciones: la derecha es “LSD correct” y la izquierda “Saline correct”.
2. A los animales se les inyecta 30 minutos antes de las sesiones de entrenamiento ya sea salina o LSD (60 μg/kg)
3. La discriminación esta en que:
   1. Las ratas que reciben **inyección de Salina**: obtienen reforzador únicamente cuando palanquean sobre la palanca asignada “Saline correct” (para el 50% de los animales es la palanca izquierda y para el otro 50% la palanca derecha)
   2. Las ratas que reciben **inyección de LSD:** obtienen reforzador únicamente cuando palanquean sobre la palanca asignada “LSD correct” (para el 50% de los animales es la izquierda y para el otro 50% es la palanca derecha)

Aclaraciones:

\*Es importante señalar que todos los animales son entrenados para ambas condiciones tanto para discriminar LSD como Salina (es decir todos reciben en ocasiones inyección de LSD o Salina y son sujetos a ambas condiciones de reforzamiento previamente señaladas, pero para unos (la mitad) las palancas están asignada de un modo y para otros (la otra mitad) las palancas están asignadas al contrario.

\*Encontré que hacer esta división de 50% - 50% en la asignación de las palancas es debido a que las ratas pueden guiar su conducta con base a rastros de olor de las ratas que previamente fueron sometidas a entrenamiento. Para evitar que esa sea una variable que influya en la respuesta, se hace un procedimiento de tipo (1-2-1-2) Primero una del grupo 1, luego otra del 2 y así consecutivamente.

\*El doctor Escobar me resolvió una duda muy grande, y es que debido a que se da esta división de grupos en la asignación de las palancas, para las sesiones siguientes en el artículo (las de extinción y todas las posteriores) se va a respetar la asignación de las palancas en el entrenamiento. Es decir, sí la rata MO6754 (un ejemplo) en entrenamiento perteneció al grupo donde derecha es “LSD correct” y la izquierda “Saline correct”, esa asignación se le va a respetar a esa rata en específico a lo largo de las demás sesiones. =) ¿Tiene sentido no?

Ok. Ya que logramos estabilizar la respuesta de discriminación (-85% de respuestas correctas) en sesiones de extinción de 2.5 minutos, se pasa ahora a las fases experimentales. Recuerden que hasta ahora, todo fue puro entrenamiento.

Aclaraciones

\*Me preguntaras, ¡espera! ¿Por qué dices que sesiones de extinción? Bueno, estas sesiones se realizaron al finalizar todas las sesiones de entrenamiento donde si se dio reforzadores, y se realizan hasta el final, solo para evaluar la estabilidad de la respuesta. Se elimina la variable reforzador y se observa la persistencia de la respuesta. (Cuando la respuesta llega a porcentajes de 85% de respuestas correctas, aún sin obtener reforzadores, se considera que se adquirió la discriminación y que las respuestas son estables.)

Ahora sí, pasamos a la *fase* ***experimental*** *de la parte de análisis conductual*:

1.- Evaluación de las dosis sobre la respuesta de discriminación (Curva Dosis-Respuesta)

De las 60 ratas que se entrenaron, solo se toman 40 y se dividen en grupos de 10. Los grupos son: inyección de salina, 15, 30 y 60 μmg/kg de LSD. Se realizan (claro está, debido a que ya estamos en fase experimental y no de entrenamiento) sesiones de extinción y se observa si la cantidad de LSD administrada afecta la capacidad de las ratas de discriminar y emitir la respuesta correcta. (Porcentaje de Respuestas Correctas)

2.- Efectos de la Administración Crónica de LSD sobre Discriminación

Se crean de las 60 ratas entrenadas, 4 grupos de (n=12) cada uno, es decir, se toman 48 ratas en total.

Los grupos son los siguientes:

1. 2 grupos LSD (uno es control y otro experimental)
2. 2 grupos Vehiculo/Salina (uno es control y otro experimental)
3. Se realiza un “pre-test” en los cuatro grupos, dos de ellos sirven como control y dos de ellos como experimental. Se obtienen líneas base.
4. Se administra por 5 días seguidos a los grupos experimentales de cada condición (LSD / Vehiculo) ya sea 130 μmg/kg o Vehiculo respectivamente.
5. 24 horas después de la última administración crónica se realizan las evaluaciones donde 30 minutos antes de las sesiones se administra ya sea 60μmg/kg de LSD o salina/vehiculo para después realizar sesiones de extinción de procedimiento de discriminación

Aclaraciones

\*Aunque ya lo dije, vuelvo a repetirlo: en las sesiones de extinción algunas ratas son del grupo donde “LSD correct” era la derecha y otras ratas son del grupo donde “LSD correct” era la izquierda durante los entrenamientos. Esto se sigue manteniendo igual aun en estas sesiones, de tal forma que la rata MO6754 (mi ejemplo de antes) se espera que después de recibir la inyección de LSD palanque en la palanca derecha en las sesiones de extinción. (eso si no hay tolerancia… claro).

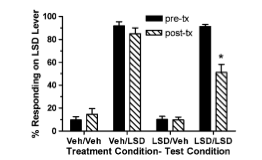
**Resultados**

De acuerdo, pues entonces en la grafica del artículo:

* *Treatment Condition:* es el tratamiento crónico, es decir, que se les inyecto crónicamente durante los 5 días.
* *Test Condition:* es que se les inyecto 30 minutos antes de realizar las sesiones.

Es claro que en las evaluaciones “pre-test” para el ultimo grupo LSD/LSD el palanqueo sobre “LSD correct” es igual que para el grupo Veh/LSD. Pero después de la administración crónica, aún a pesar de presentarles el estímulo de LSD 30 minutos antes, hay una disminución significativa de respuestas correctas… lo que demuestra que existe (se desarrollo) una tolerancia al fármaco.

Si tomamos en cuenta que como me menciono el Dr. Escobar, el **“estimulo discriminativo”** en este artículo no es tanto la “inyección *per se*” sino “la sensación interoceptiva de la rata”… es decir, la sensación de estar drogado. Después de recibir dosis de 130μg/kg…. Recibir una de 60 μg/kg, supongo yo que ya no es tan saliente y por ende les resulta más difícil “discriminar” si recibieron inyección de LSD ( si están drogados o no).



**2.- Autorradiografía**

Se tomaron un cierto número de ratas (distintas a las 60 que se usaron para la parte experimental) y se les inyecto ya sea 130 μg/kg de LSD o salina/vehiculo por 5 días diariamente. Para después sacrificarlas 24 horas después de la última dosis.

-Preparación del Tejido

Lo normal, se decapita el sujeto, se congela su cerebro y se corta en un criostato.

-Autorradiografía

Lo primero que debo explicar aquí es que la Autorradiografía es una técnica que permite observar un patrón de distribución de radiación en un tejido cualquiera. Se diferencia de la Radiografía (los Rayos-X que conocemos) debido a que la fuente de radiación no es externa sino proviene del mismo espécimen o tejido, originada por material radioactivo (agentes radioactivos) incorporados a su estructura.

Los patrones de distribución de la radiación se registran en láminas con “halides” o “isótopos” (en este caso fue carbono 14) que atrapan dicha radiación creando imágenes como las que vemos en el artículo.

Ahora. ¿Qué material radioactivo podemos usar o incorporar en el tejido para observar aquellos receptores ACTIVADOS en específico, no solo receptores, sino los ACTIVADOS?

Pues bueno primero es importante explicar que (seguramente ya lo saben, pero quiero ser bien explicita aquí) cuando un receptor acoplado a una proteína G se activa, esa “activación” se da porque hay cambios conformacionales en la estructura del receptor; entre esos cambios hay uno muy importante: Cuando la proteína G se une al receptor provoca que una molécula de GDP acoplada al receptor se “quite” y en su lugar se acople una molécula de GTP (guanosina trifosfato).

¡He ahí nuestro marcador radioactivo! En esta técnica utilizaron GTP marcado radioactivamente, de tal forma que solo los receptores activados tendrían “radioactivdad” y se mostrarían en la imagen.

Ese GTP radioactivo se denomina (35S)GTPγS, es decir (químicamente <<< ese montón de símbolos quiere decir) que se usa un GTP donde en su fosfato gamma hay un isotopo 35Sunido (un elemento radioactivo). Entonces el GTP que se uniria a los receptores por acción de la proteína G, esta marcado radioactivamente.

Ok. Entonces. ¿Cómo se hace todo el show?

Primero se utilizan buffers (que son sustancias necesarias para mantener la estructura lo mas intacta posible del tejido después de ser descongelado, pues tiene un PH igual y componente iguales al tejido extracelular evitando degradación, que las proteínas de desnaturalizen, etc etc.).

1.- Autorradiografía (35S)GTPyS:

Se tratan los cortes bajo buffers-primers (o primeros buffers) que no nos interesa su composición, pues solo se requieren para guardar la composición del tejido.

Lo que nos interesa es la posterior división de las muestras en dos grupos de tratamiento y de que están compuestos esos dos buffers de cada tratamiento:

* **Estimulación “Agonistas**”: Con este buffer se quiere observar si la administración crónica de LSD produciría una disminución en la unión de GTP radioactivo en los receptores, lo que es un sinónimo de menor activación de receptores

\*(no hay discriminación de receptores en este grupo y eso es importante… aquí se ve actividad de receptores en general.)

El buffer utilizado esta compuesto por:

a) Agonistas (5nM LSD / 5nm DOI) \*donde DOI es un agonista selectivo a receptores serotonergicos.

b) GTP radioactivo = .04-.05 (35S)GTPyS

c) 2 nM GDP

Todas las muestras se incuban en este buffer por 2 horas.

Se esperaría que las muestras de los tejidos de las ratas inyectadas crónicamente con LSD muestren menor incorporación de GTP radioactivo debido a una menor activación de los receptores aun a pesar de ser incubados en LSD o DOI. ( y si eso se obtiene) ^:^

Por ejemplo en esta imagen.

1. Son las ratas Veh/LSD: tratadas crónicamente con Vehiculo e incubadas en buffer con LSD. Ves alta radiación, pues se acoplo mucho GTP radioactivo a los receptores.
2. Ratas Veh/Veh: ratas crónicamente con Vehiculo, en buffer con Vehiculo. Obvio no hay nada que ver. ^.^
3. Ratas LSD/LSD: Ratas crónicamente con LSD, en buffer con LSD. Hay menor radiación comparada con las ratas Veh/LSD, no? INTERESANTE.
4. Ratas LSD/Veh: Ratas crónicamente con LSD, en buffer con Vehículo. Ves activación pero la residual debido al tratamiento crónico con LSD.

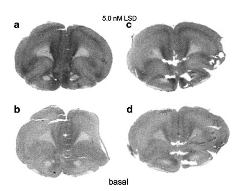
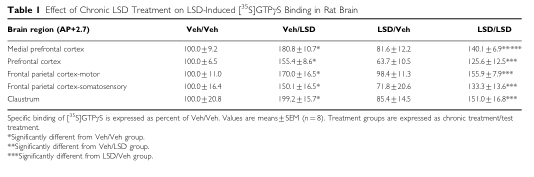


Figura 3 del Artículo.

\*Puedes basarte en mi explicación para entender las demás figuras como está.



Comparados con los valores de Veh/LSD, el grupo LSD/LSD muestra una reducción significativa del porcentaje de acoplamiento de GTP radioactivo. =)

* **Grupo “Antagonistas”:** Para este grupo si se busca especificar que receptores son los que actúan sobre el desarrollo de la tolerancia. Por eso utilizan antagonistas a dos tipos de receptores 5-HT2A y 5-HT2C.

Se tienen tres grupos: (muestras)

1. Incubadas en un buffer con puro vehiculo y GTP radiocativo
2. Incubadas en un buffer con DOI solamente (agonista a receptores 5-HT2A y 5-HT2C) y GTO radioactivo
3. PreIncubadas en un buffer con los antagonistas e incubadas posteriormente con DOI y GTP radioactivo.

Antagonistas:

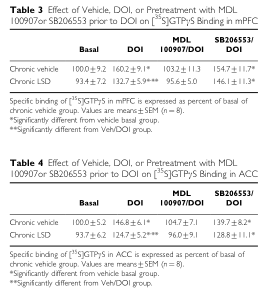
-MDL 100907 para receptores 5-HT2A

-SB 206553 para receptores 5-HT2C

Se observa que a comparación de cuando solo se incuba con DOI (grupo b), la unión de GTP radioactivo se reduce significativamente al inyectar MDL pero no SB, es decir, la acción de DOI (y por ende de LSD) seria bloqueada por antagonistas al receptor 5-HT2A y no por antagonistas a el receptor 5-HT2C, lo que indicaría que los receptores 5-HT2A tienen un papel en el desarrollo de la tolerancia a LSD.

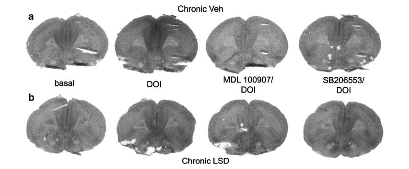
Aclaración

\*En esta parte también se utilizan muestras tanto de ratas tratadas crónicamente con LSD o con Vehiculo, pero los resultados se enfocan más en el tipo de buffer utilizado que el tratamiento crónico, sin embargo se observan diferencia entre el acoplamiento de GTP radioactivo entre las muestras tratadas con DOI solamente del grupo de tratamiento crónico vehículo contra las ratas tratadas crónicamente con LSD, claramente las últimas muestran un menor acoplamiento (menor activación de receptores)--- Ver Tablas 3 y 4



En estas tablas ves como a comparación de las muestras incubadas en puro DOI, las muestras incubadas con MDL muestran una reducción, un bloqueo de la acción de DOI. Bloqueo que no sucede para SB…

Tambien puedes observar que en la columna DOI para ambas tablas, las muestras pertenecientes al grupo “Chronic LSD” siempre tienen un porcentaje menor de acoplamiento de GTP radioactivo a comparación con las muestras del grupo “Chronic Vehicle”.



**Figura 5.** Igual que en la otra, observas las imágenes de la autorradiografía, y puedes observar los efectos tanto de MDL en el acoplamiento de GTP radioactivo como los efectos del tratamiento crónico de LSD en el acoplamiento de GTP radioactivo.

2.- Autorradiografía 125I-LSD

En esta técnica en lugar de utilizar GTP marcado radioactivamente utilizan LSD marcado radioactivamente con 125I.

Lo que se busca saber con esta adaptación es si los resultados obtenidos durante la autorradiografía de GTP radioactivo se debe a una menor eficiencia en el acoplamiento de la proteína G con los receptores o una alteración en la densidad de los receptores 5-HT2A.

Para eso se uso un buffer con LSD radioactivo. Ahora, como el LSD actúa sobre muchos receptores, el buffer también incluyo algunos antagonistas para otros receptores como D2 para dopamina y para 5-HT2C. De esta forma podemos observar la acción de la administración crónica de LSD sobre la unión del LSD específicamente en los receptores 5-HT2A.

Los resultados están en la tabla 5 del artículo, donde si hay una disminución de la unión en ciertas áreas.

Y pues bueno, eso es todo en cuanto a método. Las conclusiones y resultados creo que pueden comprenderlos mejor después de leer esto. Al menos eso espero, por que en ocasiones no soy muy clara. Una disculpa. ^.^

Saludos a todos.

Jess.