

“Efectos de la lesión química por estereotaxia del núcleo reticular del tálamo sobre la conducta de ratas en un laberinto en T después de la administración de 8-OH-DPAT”.



DR. PABLO HERNÁNDEZ
NEUROCIRUJANO

AUTORES:

**DRES. PABLO ANDRADE¹, FIACRO JIMÉNEZ²,
JOSÉ CARRILLO³ Y YLIÁN RAMÍREZ⁴.**

¹ Médico Cirujano. Alumno de la Maestría en Ciencias Médicas.

² Neurocirujano. Doctor en Ciencias Biomédicas.

³ Neurocirujano. Doctor en Ciencias Médicas.

⁴ Anestesióloga. Maestra en Administración Hospitalaria.

^{1,2,3} Escuela de Medicina y Psicología, Universidad Anáhuac. México.

Unidad de Neurocirugía Funcional,
Estereotaxia y Radiocirugía
del Hospital General de México. México.

⁴ Dirección de Investigación
del Hospital General de México. México

Email: pandradem@gmail.com

Resumen

Introducción: El 8-OH-DPAT es un agonista serotoninérgico presináptico selectivo de gran utilidad en el modelo perseverativo del laberinto en T. La administración intramuscular de clorimipramina (CMI) puede prevenir este efecto. Por otra parte, aún está de todo claro el mecanismo de acción de la neuromodulación del sistema talámico-orbitofrontal. La lesión estereotáctica del núcleo reticular del tálamo (NRT) puede ser de utilidad para entender este mecanismo.

Material y métodos: Treinta ratas Wistar macho fueron divididas en 3 grupos. Al grupo 1 (control) se aplicó solamente 8-OH-DPAT, el grupo 2 (CMI) recibió el tratamiento farmacológico previamente y el grupo 3 (NRT) fue sometido a lesión estereotáctica bilateral con AgNO₃ una semana antes del agonista serotoninérgico. Posterior a estos tratamientos cada grupo fue evaluado dentro del laberinto en T, considerando el número de perseveraciones dentro del mismo brazo. Luego se realizaron cortes histológicos para verificar la localización exacta de las lesiones. Para el análisis estadístico se emplearon la prueba t de Student para las mediciones intragrupo y ANOVA para las mediciones intergrupo.

Resultados: Se encontró una diferencia intragrupo significativa ($P < 0,05$) entre los estados pre- y post administración de 8-OH-DPAT solamente en el grupo 1. Hubo una diferencia intergrupo significativa ($P < 0,05$) en la perseveración cuando se comparó el estado post 8-OH-DPAT del grupo control con el resto de los grupos.

Conclusión: La lesión del NRT tiene el mismo efecto que el pretratamiento con CMI para prevenir la acción del 8-OH-DPAT.

Palabras clave: laberinto en T; trastorno obsesivo compulsivo; psicocirugía; tálamo

Abstract

Introduction: 8-OH-DPAT is a selective 5HT pre-synaptic agonist useful in the perseverative T-maze model. Intramuscular administration of chlorimipramine (CMI) can prevent this effect. By other hand, the mechanism of action of neuromodulation in the orbitofrontal-thalamic system in psychiatric patients is not clear enough. Reticular thalamic nucleus (RTN) is part of the orbitofrontal-thalamic system then stereotactic lesion of it could be helpful to understand this new approach.

Material and methods: Thirty male Wistar rats were divided in 3 groups. Group 1 (Control) was only submitted to 8-OH-DPAT, group 2 (CMI) received the pharmacological treatment before 8-OH-DPAT administration and group 3 (RTN) were submitted to stereotactic bilateral lesion with AgNO₃, one week before 5HT agonist administration. After specific treatment every group was evaluated into T-maze, measured by the number of perseverations in the same branch. Anatomic slices were obtained in order to verify the exact location of lesions. Statistical analysis was performed by t-Student paired for intragroup performance and ANOVA for intergroup measures.

Results: Significant differences ($P < 0,05$) intragroup were found between pre- and post injection of 8-OH-DPAT only in group 1. There was a significant difference ($P < 0,05$) intergroup in perseverations when compared the post 8-OH-DPAT state control versus the other groups.

Conclusion: RTN lesion had the same effect that CMI pretreatment group by preventing the 8-OH-DPAT action.

Key words: T-maze; obsessive-compulsive disorder; psychosurgery; thalamus

Introducción

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) tiene una prevalencia de hasta el 3% en la población mundial (aproximadamente 180 millones de personas). Alrededor del 30 al 40% de estos pacientes son refractarios a los tratamientos médicos convencionales.¹ El tratamiento farmacológico de elección incluye a la clorimipramina (CMI) e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS).^{2,3,4} En el TOC, como en prácticamente todas las alteraciones psiquiátricas, se encuentran involucrados una gran cantidad de sistemas de neurotransmisión; sin embargo, la mayor parte de los resultados señala que las monoaminas, y en particular la serotonina y la dopamina, juegan un papel relevante en la fisiopatología y el tratamiento farmacológico de la enfermedad.^{5,6}

Uno de los modelos experimentales de TOC más aceptados en la actualidad es el de la conducta de perseveración en ratas dentro de un laberinto en T producida por un agonista serotoninérgico.^{7,8,9} La alternancia espontánea es la tendencia natural que

existe en la mayoría de las especies para explorar sucesivamente ambos brazos de un laberinto en forma de T cuando ninguno de los dos o ambos contienen reforzadores. El déficit en la alternancia espontánea se manifiesta como perseveración en la elección del mismo brazo del laberinto, conducta que parece análoga a los patrones motores repetitivos que exhiben los pacientes con TOC. Este paradigma es útil como un modelo de TOC porque se somete al animal a una situación de elección que puede ser modificada por una manipulación farmacológica. En este modelo se ha demostrado que la aplicación aguda de agonistas serotoninérgicos, como el hidrobromuro de 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT), antagoniza la alternancia espontánea. Tiene además la ventaja que puede compartir factores fisiopatológicos con el TOC, porque este síndrome humano ha sido fuertemente asociado a una disfunción serotoninérgica.⁹

No obstante que se ha comprobado que la estimulación cerebral profunda del pedúnculo talámico inferior (PTI) en humanos mejora los síntomas en los pacientes con TOC y depresión,^{10,11,12} aún no se ha esclarecido por completo el mecanismo de acción en los modelos animales. La lesión de la corteza orbitofrontal, que forma parte del sistema talámico-orbitofrontal, en un modelo de gatos produjo una conducta de perseveración;¹³ pero dicho experimento fue realizado sin un instrumento de medición como el laberinto en T. La estimulación eléctrica del PTI y del núcleo reticular del tálamo (NRT) en humanos dieron como resultado efectos neurofisiológicos y clínicos similares.^{10,12} El NRT es parte del sistema talámico inespecífico que proyecta sus fibras hacia la corteza orbitofrontal.¹¹ La lesión estereotáctica del NRT en ratas pudiera equivaler a la lesión del PTI en los humanos (como sucede en la tractotomía subcaudada, que se ha utilizado para el tratamiento del TOC en humanos).¹⁴ La posibilidad de replicar los resultados clínicos mediante la manipulación de un modelo experimental que involucre a los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico proporcionaría datos sustanciales sobre su mecanismo de acción.

Material y métodos

Los criterios de inclusión fueron: ratas de laboratorio Wistar, cuidadas en bioterio con vacunas e higiene diaria, alimentación ad libitum, género macho, con peso de 250 a 350 gramos, grupos de 5 como máximo por jaula y que se mantuvieran en ciclo luz-oscuridad invertido de 10 días antes del inicio del experimento. Como criterios de exclusión se consideraron: la existencia de una enfermedad infecciosa concomitante de cualquier tipo y el antecedente de una cirugía cerebral previa. Los criterios de eliminación o retiro de la prueba fueron: daño evidente debido a manipulación quirúrgica, como sangrado o infección, y perseveración en un mismo lado (derecha o izquierda) en el laberinto en T por más de 3 ocasiones durante los ensayos previos a la administración de 8-OH-DPAT.

Se formaron tres grupos de 10 ratas adultas cada uno. A las ratas del grupo 1 (control) se administró solamente 8-OH-DPAT; a las del grupo 2 (tratamiento farmacológico) se aplicó un pretratamiento con CMI y posteriormente 8-OH-DPAT; a las del grupo 3 (lesión estereotáctica) se sometió a lesión química por estereotaxia del NRT y administración de 8-OH-DPAT.

El aparato utilizado para medir la perseveración fue un laberinto en T elaborado con plexiglás, con brazos similarmente pintados. Los tres brazos miden 50 cm de largo, 10 cm de ancho y sus paredes 15 cm de altura. Los brazos están separados entre sí por puertas de guillotina, con una zona neutra de 10 x 10 cm en el centro de los brazos. En los extremos de cada brazo lateral o secundario se colocaron recipientes de plástico que contenían leche con chocolate, que se utilizaron como reforzadores en las pruebas, en todos los casos. El laberinto estaba cubierto por tres tapas independientes deslizables (para los brazos) y una tapa fija para el centro del laberinto hechas con plexiglás transparente.⁹

Para la prueba con el modelo del laberinto en T se requirieron 3 días para el acondicionamiento previo y uno para la evaluación final. El primer día, se permitió a cada roedor explorar libremente el laberinto durante 20 minutos. El segundo día, se dejó que el animal permaneciera durante 5 minutos en cada uno de los brazos secundarios del laberinto, independientemente del lado que había escogido primero. El tercer día la rata fue colocada en el laberinto para que lo recorra libremente y elija alguno de los dos brazos laterales (izquierda o derecha) de modo que pudiésemos cuantificar la perseveración sobre el mismo brazo; esta maniobra se realizó durante 9 ensayos. Cuando el roedor no elegía ninguna de las dos opciones durante 90 segundos, era removido y se contabilizaba como un intento nulo. Para considerar que el animal había escogido alguna de las opciones, la elección se contabilizaba una vez que la rata colocaba las cuatro patas dentro del brazo (Figura 1).

El cuarto día se buscó replicar la conducta de perseveración mediante la administración del agonista serotoninérgico, 8-OH-DPAT (H8520, Sigma[®]), vía intraperitoneal (IP), a una dosis de 1,0 mg/Kg de peso, 15 minutos antes de ser sometidos a la prueba del laberinto. Durante este último día, se realizaron 7 ensayos de manera semejante a lo efectuado en el tercer día; todas las elecciones fueron contabilizadas. Las ratas del grupo 2 recibieron un pretratamiento con CMI (I0899-5G, Sigma[®], St. Louis, MO, USA) vía intramuscular a razón de 15 mg/Kg administrada 24, 4 y 1 horas antes de la prueba del cuarto día.⁹ Las del grupo 3 fueron sometidas a una lesión estereotáctica del NRT una semana antes de la prueba en el laberinto para permitirles la recuperación de la cirugía. Después de la prueba los animales de este grupo fueron sacrificados para corroborar el sitio de la lesión mediante el examen de los cortes histológicos.

El procedimiento de la lesión estereotáctica es el siguiente: Se anestesia al roedor con Ketamina, 100 mg/Kg (50 mg/mL), vía IP, se lo monta en un aparato estereotáxico específico para roedores (modelo 1200, Kopf Instruments[®], Tujunga, CA, USA) y se rasura con máquina eléctrica el área de la cabeza para su posterior manipulación. Luego de aplicar medidas de antisepsia con yodo, se aplica lidocaína subcutánea (0,4 mL al 2%, 20 mg/mL); posteriormente, mediante una incisión en la línea media se corta la piel con bisturí, luego se separa el periostio con una legra. Una vez identificado el bregma, se coloca la punta de una aguja Hamilton (2,0 μ L, N^o 87900) previamente cargada con nitrato de plata (AgNO₃ al 2%), para determinar el cero absoluto de las coordenadas. Se calcula las coordenadas estereotácticas del NRT mediante el Atlas Paxinos de cerebro de rata ($x = \pm 1,9$ mm, $y = - 6,0$ mm, $z = - 1,4$ mm).¹⁵ Empleando el bisturí se hace un agujero de trepanación a 1,9 mm de la línea media en cada lado, sobre los sitios de entrada (Figura 2), y se introduce la aguja dentro del encéfalo. La microinyección de 0,3 μ L de AgNO₃ se realiza durante un minuto y se deja la aguja en su lugar durante otro minuto más para evitar el efecto de vacío al momento de retirarlo. La herida quirúrgica se sutura con seda 2-0.

Otra variable que se consideró en todos los grupos fue la **latencia o tiempo de indecisión**, que se define en este experimento como el tiempo, expresado en segundos, que transcurre desde que el animal es depositado dentro del brazo principal del laberinto hasta que selecciona alguno de los brazos secundarios.

Para el análisis estadístico, las variaciones intragrupo de las respuestas alternantes o no alternantes de los animales del estudio fueron evaluados con la prueba *t* de Student para muestras pareadas. Las variaciones intergrupo fueron evaluadas con el ANOVA.

Resultados

El número final de ratas para cada uno de los grupos fue de 10 animales, con un total de 30. Ningún roedor perseveró en un mismo lado más de 3 veces antes de la prueba como para ser retirado de la misma. Antes de la administración de 8-OH-DPAT el grupo 1 (Control) presentó una media basal de 1,5 perseveraciones; el grupo 2 (CMI), de 1,4, y el grupo 3 (Lesión del NRT), de 1,7. Estos datos demuestran que existía una equivalencia entre los grupos en el período basal. Después de la administración de 8-OH-DPAT en el grupo control se observó un promedio de 3,5 perseveraciones, es decir, hubo una diferencia intragrupo estadísticamente significativa ($P = 0,003$) entre los estados pre- y post 8-OH-DPAT. En los otros grupos no ocurrió lo mismo ya que se encontró una media de 2,2 perseveraciones en el grupo CMI ($P = 0,12$) y de 2,3 en el grupo Lesión del NRT ($P = 0,27$) (Figura 3).

Al comparar el número de perseveraciones de todas las ratas en el estado post administración de 8-OH-DPAT de los tres grupos y del total en el estado basal,

se encontró una diferencia intergrupo con significancia estadística ($P < 0,05$) (Figura 4).

Respecto a la latencia para escoger alguno de los dos brazos secundarios del laberinto en T, encontramos que únicamente hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el basal y el estado post 8-OH-DPAT del grupo control ($P < 0,05$), pues el tiempo de indecisión en este grupo fue mucho mayor en comparación con los otros dos (Figura 5), en los cuales no se evidenció un incremento significativo ($P = 0,98$ para el grupo CMI y $P = 0,10$ para el grupo Lesión del NRT).

El estudio histopatológico evidenció que en todas las ratas del grupo quirúrgico incluidas en este trabajo las lesiones se encontraban situadas acordes a las coordenadas planeadas (Figura 6).

Discusión y conclusiones

Este estudio demostró que con la lesión del NRT se obtiene un efecto preventivo de las perseveraciones, de manera semejante al obtenido con el tratamiento farmacológico con CMI. Su mecanismo de acción podría explicarse como una interrupción de las vías del sistema talámico-orbitofrontal antes de su aferencia a la corteza orbitofrontal. Al disminuir la actividad excitatoria del NRT dentro del sistema paralímbico córtico-estriado-tálamo-cortical, facilita un mecanismo de inhibición de la corteza orbitofrontal. Previamente se había demostrado que la corteza

orbitofrontal juega un papel inhibitorio importante sobre el TOC.¹⁴

Actualmente, la teoría con mayor evidencia sobre la fisiopatología del TOC involucra un déficit de serotonina sobre ciertos receptores presinápticos dopaminérgicos en el sistema nigro-estriado; esto produce un exceso de dopamina a nivel postsináptico.¹⁶ El efecto de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) o el de la CMI compensaría el déficit serotoninérgico que se aprecia en el TOC.

En el TOC parecer existir un estado de hiperactividad de la porción ventral del estriado, que mejora con la capsulotomía, la tractotomía subcaudada o la estimulación eléctrica del brazo anterior de la cápsula interna.^{14,17} El sistema talámico reticular proyecta sus aferencias a la corteza orbitofrontal y, al parecer, comparte estructuras y función con el estriado ventral, lo se que debe revisar de manera más amplia.

No obstante que este es un estudio preliminar, se comprueba que el tratamiento quirúrgico mencionado tiene una efectividad semejante al tratamiento farmacológico con CMI. Existen estudios respecto a la conducta de perseveración en ratas que sugieren que el sistema serotoninérgico está relacionado a la conducta compulsiva inducida por la lesión de la corteza orbitofrontal;¹⁸ pero es necesario que luego de emplear diferentes modelos animales de TOC, en el futuro se establezca claramente la correlación existente entre las diversas estructuras anatómicas involucradas.

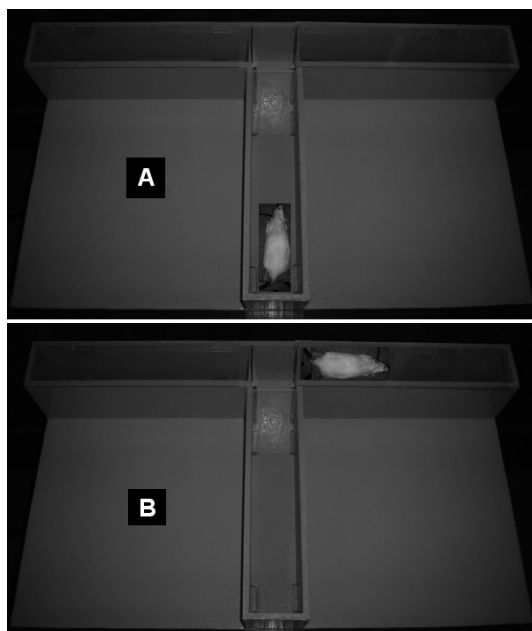


Figura 1. En la parte superior (A) se observa al roedor depositado en la posición inicial, en el brazo principal, antes que este avance y tome la decisión de dirigirse hacia alguno de los dos brazos secundarios. En la parte inferior (B) se observa a la rata justo en el momento en que ha puesto las cuatro patas dentro del brazo secundario; en este caso el roedor eligió el derecho.



Figura 2. Rata fijada al aparato estereotáxico para roedores, momento después de la realización de los agujeros de trepanación realizados de forma bilateral, a 1,9 mm de la línea media en cada lado.

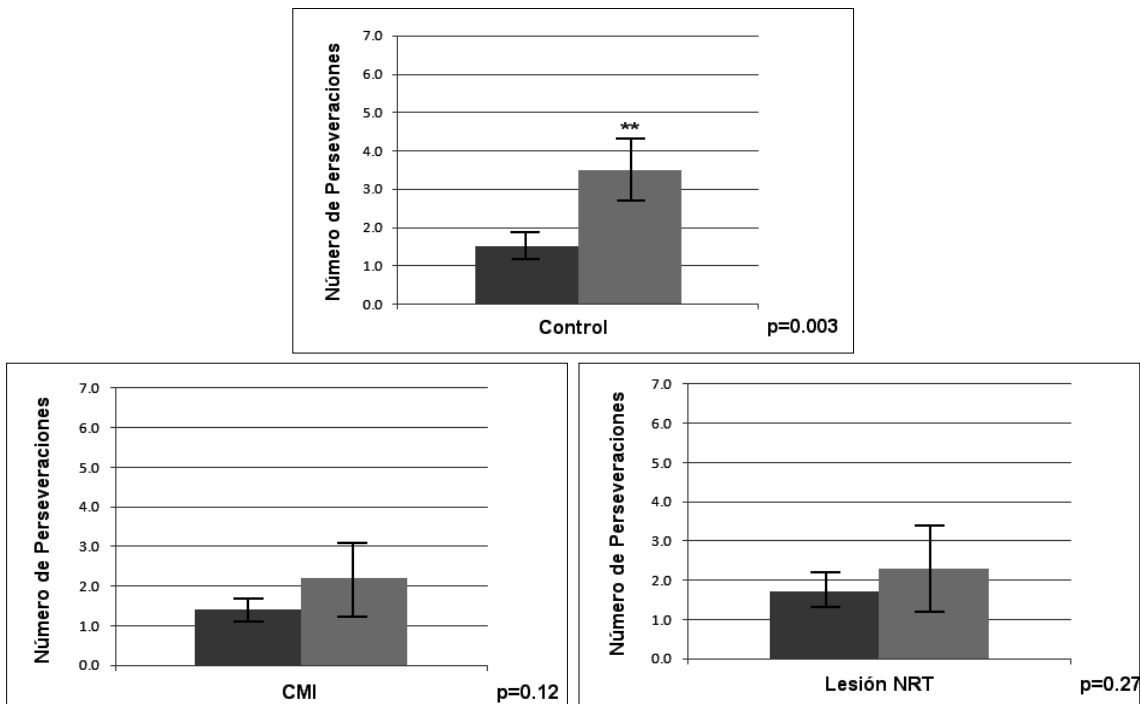


Figura 3. Comparaciones intragrupo entre el número de perseveraciones pre- 8-OH-DPAT (barra gris oscuro) y post 8-OH-DPAT (barra gris claro). En el grupo control se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,003$) entre ambos estados, lo que demuestra que con la sola aplicación de 8-OH-DPAT se produce la conducta de perseveración. No ocurre lo mismo en los grupos CMI y Lesión del NRT pues en ellos no se encontró diferencias importantes entre el estado previo y el posterior a la administración del químico; esto evidencia el efecto protector de estos tratamientos ante la acción del agonista serotoninérgico.

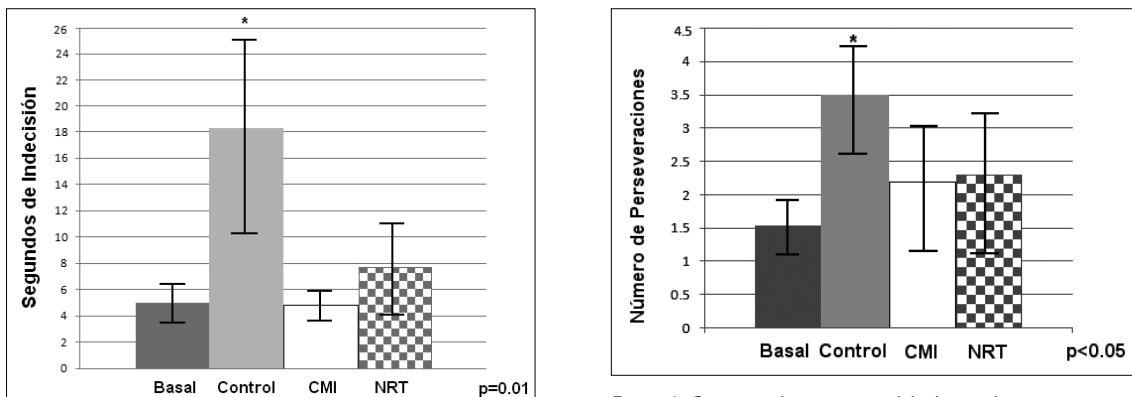


Figura 5. La latencia o tiempo de indecisión, expresado en segundos, muestra el tiempo que tarda el roedor en escoger alguno de los brazos del laberinto. El único grupo en el que se observó diferencia entre los estados basal (barra gris oscuro) y post 8-OH-DPAT fue el control (gris claro) ($p < 0,05$). En los demás grupos (barras blanca y cuadriculada) los resultados fueron similares al obtenido en el estado previo a la administración del químico.

Figura 4. Comparación intergrupo del número de perseveraciones durante el estado basal sin 8-OH-DPAT (barra gris oscuro) de todos los animales ($n = 30$) y durante el estado post administración del químico en los grupos control (gris claro), CMI (blanco) y Lesión del NRT (cuadriculado), con $n = 10$ en cada grupo. Se encontró que hubo una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos, lo que demuestra nuevamente la eficiencia de las terapéuticas mencionadas ante los efectos del 8-OH-DPAT.

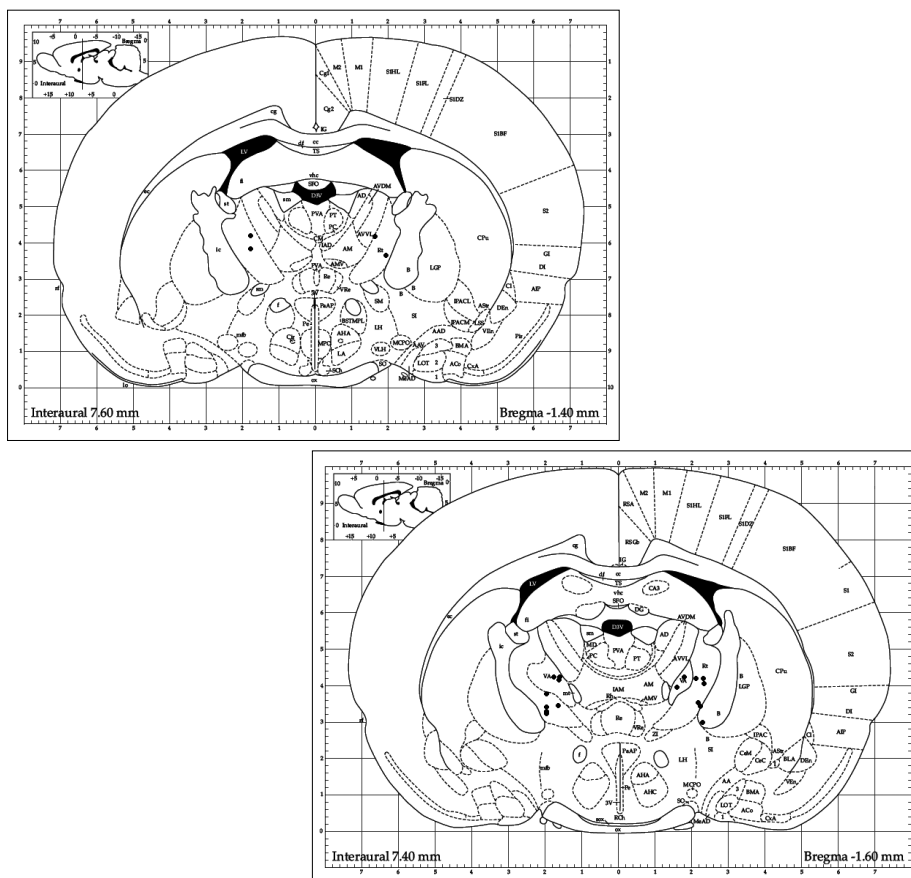


Figura 6. Ploteo de la localización de las lesiones, comprobada por el estudio histopatológico sobre el Atlas Paxinos de cerebro de rata. En la imagen superior se observa un corte coronal a 1,4 mm posterior al bregma con el centro de las lesiones en dos de las ratas del grupo 3. En la imagen inferior el corte está a 1,6 mm posterior al bregma con el centro de las lesiones de las otras ocho ratas. La diferencia de niveles respecto al bregma es debido a que cada punto se marca en donde se considera se encuentra localizado el centro de la lesión. Todas las lesiones son bilaterales y están localizadas en el sitio deseado dentro de las estructuras correspondientes al NRT.

Referencias

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR. 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Pub; 1994.
2. Millet B, Jaafari N. Traitement du trouble obsessionnel compulsif. [Treatment of obsessive-compulsive disorder][Article in French] Rev Prat. 2007;57(1):53-7.
3. Eddy KT, Dutra L, Bradley R, Westen D. A multidimensional meta-analysis of psychotherapy and pharmacotherapy for obsessive-compulsive disorder. Clin Psychol Rev. 2004;24(8):1011-30.
4. Fallon BA, Mathew SJ. Biological therapies for obsessive-compulsive disorder. J Psychiatr Pract. 2000;6(3):113-28.
5. Goddard AW, Shekhar A, Whiteman AF, McDougle CJ. Serotonergic mechanisms in the treatment of obsessive-compulsive disorder. Drug Discov Today. 2008;13(7-8):325-32.
6. Flaisher-Grinberg S, Klavir O, Joel D. The role of 5-HT2A and 5-HT2C receptors in the signal attenuation rat model of obsessive-compulsive disorder. Int J Neuropsychopharmacol. 2008;1-15.
7. van Kuyck K, Demeulemeester H, Feys H, De Weerd W, Dewil M, Tousseyn T, et al. Effects of electrical stimulation or lesion in nucleus accumbens on the behaviour of rats in a T-maze after administration of 8-OH-DPAT or vehicle. Behav Brain Res. 2003;140(1-2):165-73.
8. Ulloa RE, Nicolini H, Fernández-Guasti A. Age differences in an animal model of obsessive-compulsive disorder: participation of dopamine: dopamine in an animal model of OCD. Pharmacol Biochem Behav. 2004;78(4):661-6.
9. Yadin E, Friedman E, Bridger WH. Spontaneous alternation behavior: an animal model for obsessive-compulsive disorder? Pharmacol Biochem Behav. 1991;40(2):311-5.
10. Velasco M, Velasco F, Jiménez F, Carrillo-Ruiz JD, Velasco AL, Salín-Pascual R. Electrocortical and behavioral responses elicited by acute electrical stimulation of inferior thalamic peduncle and nucleus reticularis thalami in a patient with major depression disorder. Clin Neurophysiol. 2006;117(2):320-7.
11. Velasco F, Velasco M, Jiménez F, Velasco AL, Salín-Pascual R. Neurobiological background for performing surgical intervention in the inferior thalamic peduncle for treatment of major depression disorders. Neurosurgery. 2005;57(3):439-48.
12. Jiménez F, Velasco F, Salín-Pascual R, Velasco M, Nicolini H, Velasco AL, et al. Neuromodulation of the inferior thalamic peduncle for major depression and obsessive compulsive disorder. Acta Neurochir Suppl. 2007;97(Pt 2):393-8.
13. Velasco M, Lindsley DB. Role of orbital cortex in regulation of thalamocortical electrical activity. Science. 1965;149(690):1375-7.
14. Lipsman N, Neimat JS, Lozano AM. Deep brain stimulation for treatment-refractory obsessive-compulsive disorder: the search for a valid target. Neurosurgery. 2007;61(1):1-11.
15. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press; 1982.
16. Shiloh R, Nutt D, Weizman A. Atlas of Psychiatric Pharmacotherapy. 2nd ed. London, UK: Martin Dunitz; 2000.
17. Nuttin BJ, Gabriëls LA, Cosyns PR, Meyerson BA, Andréewitch S, Snaert SG, et al. Long-term electrical capsular stimulation in patients with obsessive-compulsive disorder. Neurosurgery. 2003;52(6):1263-72.
18. Joel D, Doljansky J, Roz N, Rehavi M. Role of the orbital cortex and of the serotonergic system in a rat model of obsessive compulsive disorder. Neuroscience. 2005;130(1):25-36.