

Sensibilización del condicionamiento por 6-OHDA

Se ha descrito que la aplicación de Dopamina (DA) en el núcleo caudado (NC), mejora el aprendizaje de la supresión de una respuesta condicionada motora (RCM). Sin embargo, la aplicación de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) a dosis de 5, 10 y 20 µgs produjeron también un incremento significativo de esta fase supresora. Por el contrario, dosis de 80 o de 160 µgs produjeron un significativo decremento de la supresión de esta RCM. Se postuló que las dosis bajas de 6-OHDA aunque producen lesiones de las estructuras dopaminérgicas causan una hipersensibilidad por denervación, para comprobarlo se observó el efecto de la aplicación de DA en el NC antes o consecuentemente a la aplicación de una dosis de 6-OHDA. se condicionaron gatos a presionar una palanca (RCM) en presencia de un estímulo discriminativo (luz) que era reforzada con 0.5 ml de leche. Las presiones de la palanca en ausencia de luz (SRCM) no se reforzaban. Las varias aplicaciones de 10 µgs de DA en ambos NC, siempre produjeron decremento de las presiones de palanca en la situación de SRCM. El efecto de las aplicaciones de DA posteriores a la 6-OHDA, siempre fueron más significativos que las aplicaciones antes de la misma ($P < 0.01$). Estos hallazgos dan más apoyo a la sugestión de que las catecolaminas en el NC facilitan las acciones inhibitorias necesarias para la supresión de respuestas motoras.

Dres. Cruz Reyes y
Héctor Brust-Carmona
Departamento de Fisiología,
División de Investigación
Facultad de Medicina, UNAM

La participación de los sistemas catecolaminérgicos (CA) centrales en diferentes procesos de aprendizaje es avalada por un gran número de observaciones experimentales; por ejemplo, en respuestas del tipo de condicionamiento de prevención activa,⁶⁻¹¹ de prevención pasiva y alimenticias clásicas,¹⁴ inclusive en respuestas de autoestimulación,¹⁸ así como también en respuestas en laberintos.¹ Por otro lado, se han descrito datos que indican que estas sustancias participan en el control de la actividad motora y emocional de ratas.²⁰ Aún más, se ha sugerido que conductas motoras aprendidas se modifican al cambiar las concentraciones de dopamina (DA) y norepinefrina (NE).² En particular, se ha observado que la aplicación local de Da en la cabeza del núcleo caudado (NC) mejora el aprender a suprimir (inhibir) una respuesta con-

dicionada motora (RCM), como la de presionar una palanca.²⁰

En el trabajo previo,¹⁹ se intentó demostrar que al disminuir la concentración de DA en el núcleo caudado, los gatos se vuelven incapaces de aprender a suprimir ese tipo de respuesta condicionada instrumental. Esto efectivamente se observó, pero utilizando dosis relativamente altas de 6-OHDA (40,80 160 µg); en contraste, una dosis baja (20 µg) produjo un incremento de la supresión, ya que los animales presionaron menos la palanca. Como explicación a esta observación, sugerimos que este efecto resulta de una sensibilización por denervación desencadenada por una lesión parcial de los sistemas dopaminérgicos. Efecto que se ha descrito ampliamente para estructuras sinápticas periféricas,²² y existen algunos datos al respecto obtenidos en estructuras centrales.⁵ El presente trabajo proporciona datos que apoyan esta interpretación.

Método

Los experimentos se efectuaron en gatos, sin consideración de sexo, y con un peso corporal

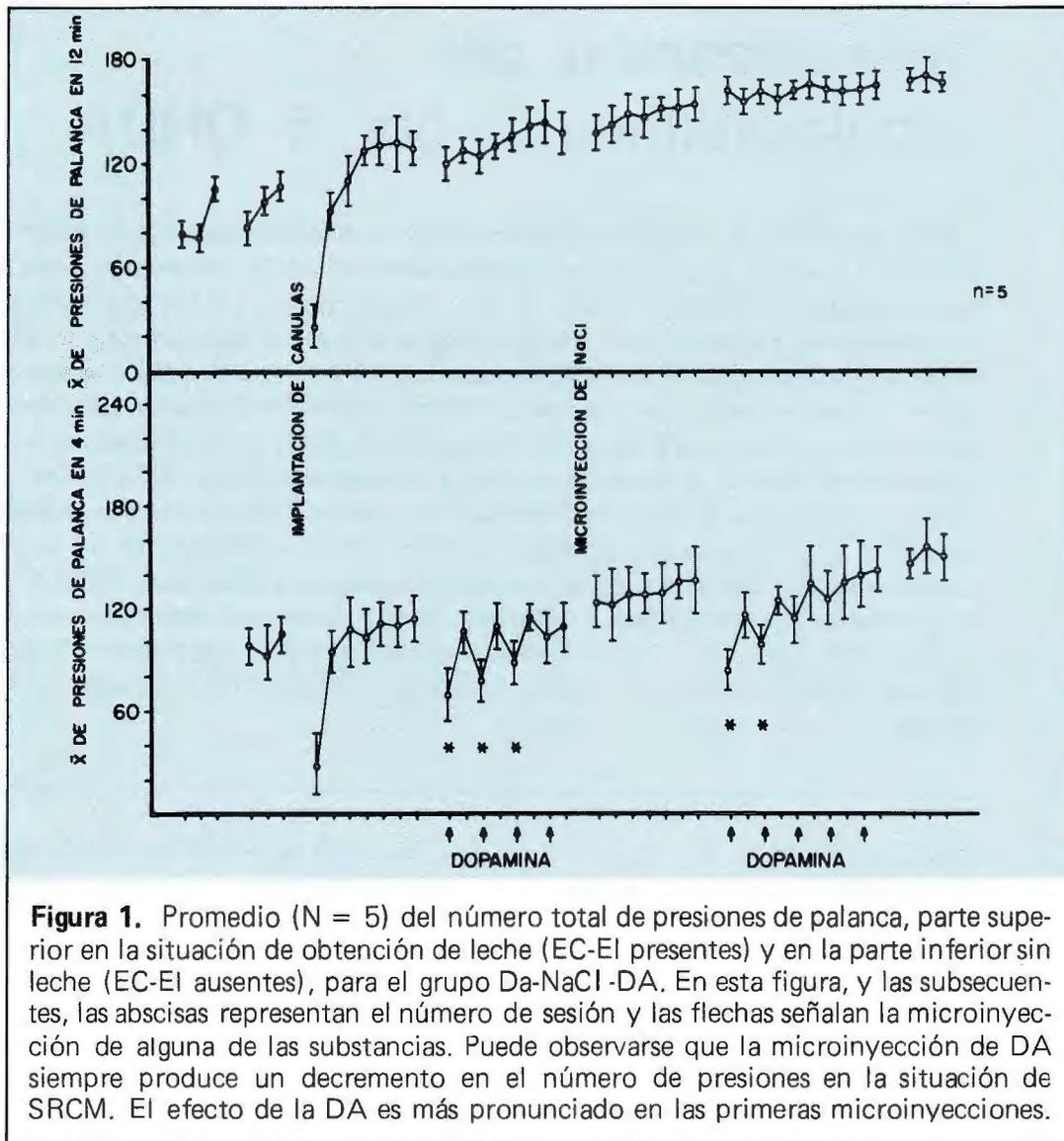
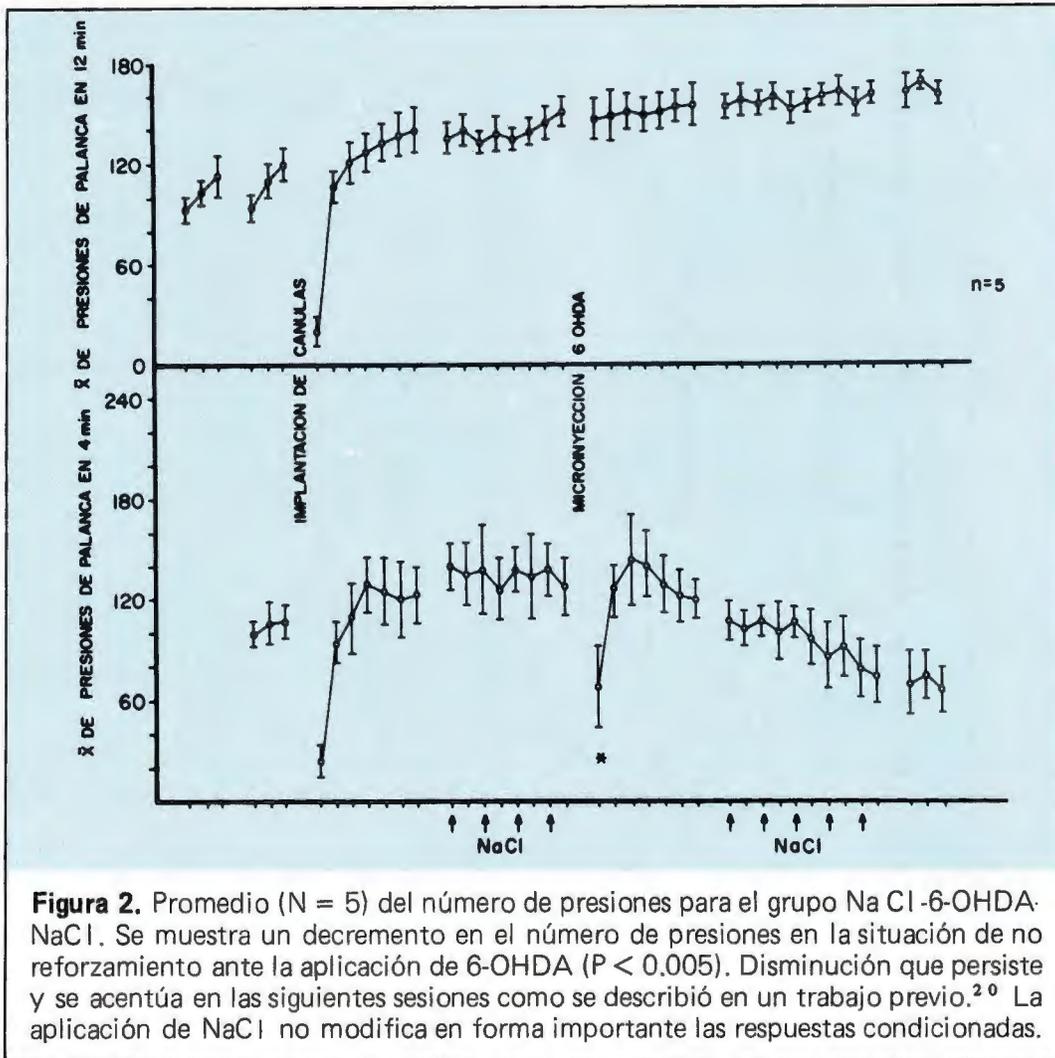


Figura 1. Promedio (N = 5) del número total de presiones de palanca, parte superior en la situación de obtención de leche (EC-EI presentes) y en la parte inferior sin leche (EC-EI ausentes), para el grupo Da-NaCl-DA. En esta figura, y las subsecuentes, las abscisas representan el número de sesión y las flechas señalan la microinyección de alguna de las sustancias. Puede observarse que la microinyección de DA siempre produce un decremento en el número de presiones en la situación de SRCM. El efecto de la DA es más pronunciado en las primeras microinyecciones.

que osciló entre 2 y 3 kg. Estos gatos fueron entrenados para obtener aproximadamente .5 ml de leche (estímulo incondicional, EI) cada vez que presionaban una palanca (respuesta condicionada motora, RCM) localizada en una cámara de condicionamiento tipo Skinner (Lehigh Valley Electronics) colocada dentro de un cuarto sonoamortiguado.

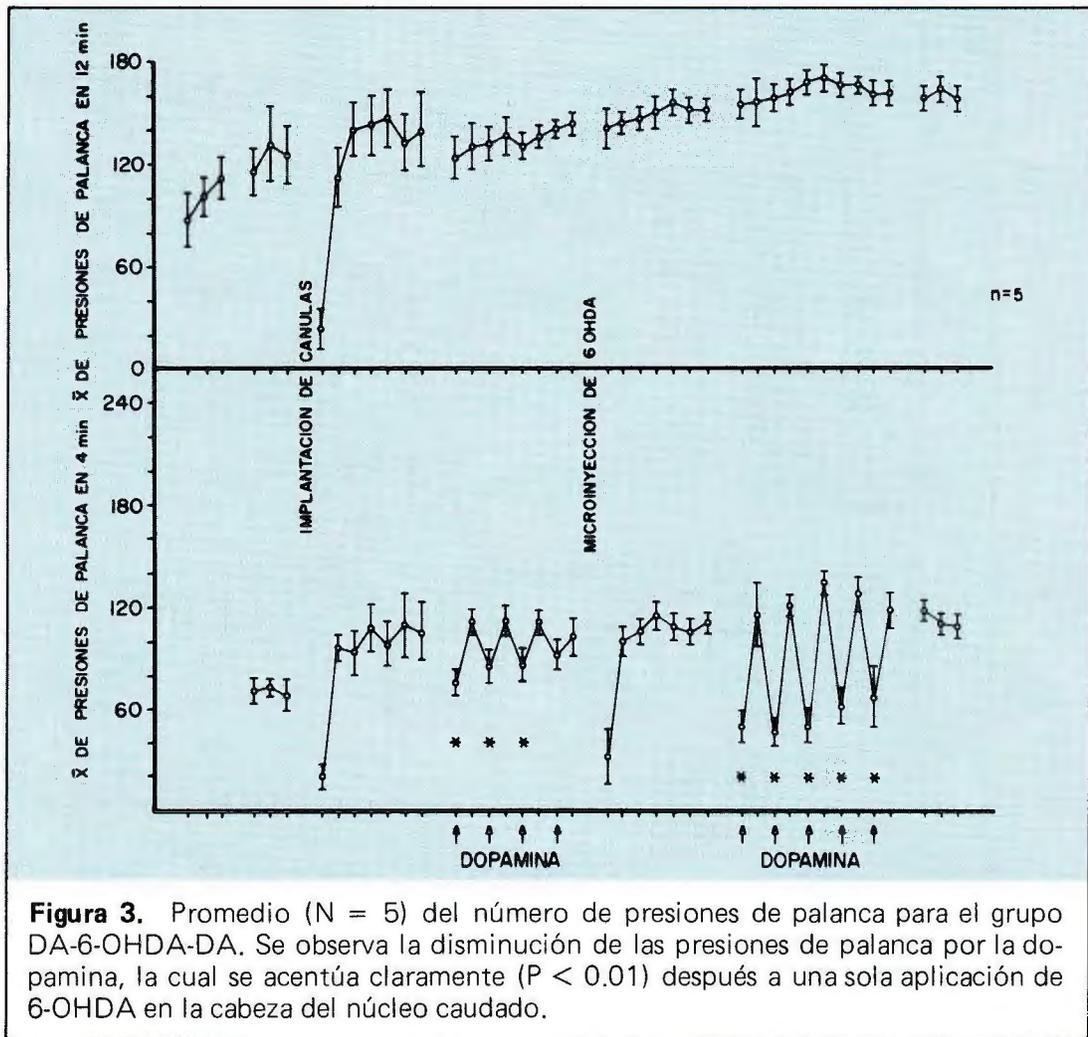
Inicialmente, la sesión duraba 12 minutos, durante los cuales el sujeto podía presionar la palanca y, si una pequeña señal luminosa (estímulo condicionado, EC), colocada por encima de la palanca se encontraba encendida, recibía el EI. Este patrón de condicionamiento se repetía durante tres sesiones consecutivas (tres

días). Con la cuarta sesión (cuarto día), después de cada periodo de un minuto, con la luz encendida, se continuaba con 20 segundos en los que no se presentaba el EC, y no se daba el reforzador (EI) si el sujeto presionaba la palanca. En este periodo, se espera que el animal suprima las presiones de palanca, "supresión de la respuesta condicionada motora, SRCM". En estas condiciones, la duración de la sesión se incrementaba a un total de 16 minutos. El total de presiones de palanca, en ambas situaciones, era automáticamente registrado. Después de cada sesión, los sujetos recibían carne fresca a razón de aproximadamente 35 g/kg de peso corporal.



Después de tres sesiones consecutivas con binadas (EC-presente y EC-ausente), los sujetos fueron anestesiados con pentobarbital sódico a dosis de 37 mg/kg de peso, y colocados en un aparato estereotáxico. En esta situación, se implantaron dos cánulas de acero inoxidable con un diámetro exterior de 0.7 mm y con un mandrill deslizante, que obstruía la luz de la cánula, en la porción anteroventral de la cabeza del NC, de acuerdo a las coordenadas A=16.0, Lat=4.5 y H=4.5, tomadas del atlas de Jasper y Ajmone-Marsan.^{1,2} Dichas cánulas se fijaban al cráneo por medio de acrílico dental. La estabilidad de las mismas se aumentó por medio de 3 tornillos fijos al hueso de los senos frontales. Generalmente, las sesiones de condicionamiento se reiniciaron al día siguiente de la implanta-

ción, y se repitieron en las mismas condiciones durante siete sesiones más. En la octava sesión, en 10 sujetos, se inició un periodo de 4 microinyecciones (por medio de una aguja de carput, la cual una vez que se extraía el mandrill, se ajustaba exactamente en la cánula implantada y llegaba hasta la punta; dicha aguja se conectaba a una microjeringa por medio de un tubo de polietileno) de DA, y 5 gatos se sometieron a un periodo de microinyecciones de 5 μ l de NaCl 0.9 por ciento. Estas sesiones de microinyecciones siempre se intercalaron con sesiones de falsa inyección (FI) que consistieron en que 10 minutos antes de que se iniciara el condicionamiento, se extraía el mandrill de la cánula y se introducía el inyector por 20 segundos sin aplicar sustancia alguna. La solución de DA se pre-



paró, disolviendo 2 mg de DA-HCl (3, 4 dihidroxifeniletilamina HCl, Nutritional Biochemicals Corporation) en 1 ml de agua bidestilada inmediatamente antes de su aplicación. La dosis empleada fue de 10 μ g en un volumen de 5 μ l. La sesión de condicionamiento se efectuó 10 minutos después de la microinyección. Se procuró que la microinyección se aplicara en un tiempo de 20 segundos para cada lado. Las inyecciones siempre fueron bilaterales. Terminado este primer periodo de 4 microinyecciones y de 4 FI, en la siguiente sesión a cinco de los gatos que habían recibido DA, y a los cinco que recibieron NaCl se les practicó una sola microinyección de 20 μ g de 6-OHDA. La solución de 6-OHDA se preparó disolviendo 2 mg de bromuro de 6-OHDA (2, 4, 5 trihidroxieniletilamina hidrobromurada cristalina, SIGMA) en 0.5 ml

de agua bidestilada, inmediatamente antes de su aplicación. El tiempo de inyección fue de 20 segundos en cada lado. A los otros cinco sujetos que habían recibido DA en lugar de la 6-OHDA, se les hizo una sola microinyección de 5 μ l de NaCl (0.9 por ciento). Diez minutos después, se iniciaba la sesión de condicionamiento. Este tipo de sesiones de condicionamiento se repitieron por seis ocasiones más, al final de las cuales, los animales fueron sometidos a una segunda serie de cinco microinyecciones de DA o de NaCl en los grupos correspondientes, con las mismas características del primer periodo; procurando que las sesiones fueran diarias. Esto llevó a la integración de tres grupos de cinco sujetos cada uno: el a) recibió NaCl, una de 6-OHDA, NaCl; el b) DA, una de 6-OHDA; y el c) DA, una de NaCl, Da.

Una vez finalizado este periodo de microinyecciones, se les administró una sobredosis de pentobarbital sódico, por vía intraperitoneal, para perfundir el cerebro a través del ventrículo izquierdo, primero con solución salina al 0.9 por ciento, y posteriormente con formalina al 10 por ciento. Se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en una solución de formalina al 4 por ciento durante un periodo de 2 a 4 semanas, para después seleccionarlos en dirección coronal (cortes de 20 a 60 micras aproximadamente) por medio de un microtomo de congelación. Para localizar los sitios en que permanecieron las puntas de las cánulas, se hicieron impresiones en papel fotográfico usando los cortes histológicos como negativos en un amplificador.¹³

Estadística

El promedio de presiones de palanca de los diferentes grupos se comparó con una prueba F. Posteriormente, las diferencias entre el número de presiones de palanca en cada sesión de microinyección de DA, de NaCl o de 6-OHDA, y los obtenidos en la falsa inyección se evaluaron con la prueba t Student para muestras correlacionadas. Por último, la disminución del número de presiones de palanca consecutiva a la aplicación de dopamina antes y después de la aplicación de 6-OHDA o de NaCl, se comparó con la prueba t Student.

Resultados

Después de la implantación bilateral de cánulas en la cabeza del núcleo caudado (24-48 hrs), se observó una disminución de presiones de la palanca en ambas situaciones (RCM y SRCM). Sin embargo, los sujetos tendieron a recuperar su nivel promedio de presiones de palanca en 2 a 3 días más.

Como ya se mencionó, las sesiones de condicionamiento se iniciaban 10 minutos después de las microinyecciones. En este periodo de espera, ocasionalmente, después de la aplicación de DA, se observaron temblores distales de la cola y de las extremidades, con ligera rigidez de los músculos extensores y, con menos frecuencia, se observó rotación de la cabeza hacia uno y otro lado. Estos efectos se observaron en la pri-

mera, o a veces en la segunda inyección de DA, y sólo en 7 sujetos, y tendían a desaparecer rápidamente, de manera que al meterlos en la cámara de condicionamiento, no mostraban ningún dato motor anormal visible. También es importante señalar que, en ningún momento, se observaron cambios en el área vegetativa, como micción, defecación, salivación o piloerección. Dentro de las cámaras los animales a los que se les aplicó DA presionaban la palanca en la situación de luz encendida-EI, en forma muy similar a como lo habían efectuado en días previos (primera porción de la parte superior de la figura 1). En cambio, en la situación de supresión, los animales presionaban menos frecuentemente la palanca (primera porción de la parte inferior de la figura 1). Efecto que es estadísticamente significativo al nivel de $P < 0.01$ en la primera y segunda inyección, y a nivel de $P < 0.05$ en la tercera, y no significativo en la cuarta microinyección. La microinyección de NaCl no produjo ningún cambio importante, tanto en la actividad motora espontánea como tampoco en las respuestas condicionadas RCM o SRCM. Esto se ilustra en la primera parte de la figura 2.

La aplicación de la única dosis de 20 μ g de 6-OHDA produjo una ligera rigidez de los músculos extensores y pequeños movimientos involuntarios, principalmente de los miembros anteriores, que eran más evidentes cuando el sujeto estaba en reposo. Sin embargo, 10 minutos después, todos los animales fueron capaces de comer por sí mismos. Después de la aplicación de 6-OHDA, se observó un decremento en el número de presiones de palanca en la situación de SRCM que, al comparar ese número con el observado después de la aplicación de NaCl, resulta significativo ($P < 0.005$). Las microinyecciones de DA aplicadas después de la 6-OHDA produjeron una disminución todavía más acentuada de las presiones de palanca en la situación de SRCM. De tal manera que la comparación del nivel de presiones de palanca después de la FI con la aplicación de DA resulta estadísticamente diferente a nivel de $P < 0.005$ para la primera y segunda microinyección, y de $P < 0.001$ para la tercera y cuarta. Este efecto se ilustra en la segunda parte de la figura 1 del

grupo DA-6-OHDA-DA. Es más, si se comparan los decrementos producidos por la DA antes y después de la aplicación de 6-OHDA, resulta estadísticamente significativa la diferencia ($P < 0.01$). En contraste, este efecto de potenciación de la DA no es observado después de la aplicación de NaCl (obsérvese la segunda parte de la figura 3 del grupo DA-NaCl-DA). También, si se compara la reducción del número de presiones de palanca en la situación de SRCM producido por la DA, antes y después de la única aplicación de NaCl, se observa que no difieren a un nivel estadísticamente significativo. Por último, es importante señalar que la microinyección de NaCl antes o después de 6-OHDA (grupo NaCl-6-OHDA-NaCl) no produce efectos importantes en las respuestas condicionadas estudiadas (2a. parte de la figura 2). Todos estos datos se presentan en el cuadro No. 1).

Interpretación

Los datos presentados apoyando la participación funcional del núcleo caudado en los procesos de aprendizaje motor, demuestran la existencia de dos porciones reguladoras de estos tipos de condicionamiento puesto que, como pudo observarse, las drogas empleadas en este trabajo: DA y 6OHDA (drogas de índole catecolaminérgico) afectaron exclusivamente la fase de supresión de la RCM; en otras palabras su acción se ejerció exclusivamente sobre la inhibición, dejando probablemente intacta la facilitación de la actividad motora. Este mismo hecho también es útil para puntualizar que el efecto de estas drogas no se ejerce debido a una inmovilidad del sujeto experimental, puesto que el animal continuó presionando la palanca cuando recibió el estímulo incondicional (leche). Una de las observaciones interesantes del presente trabajo es la aplicación repetida de la DA hace que el efecto cada vez sea menos importante. Una explicación de este fenómeno podrá ser la creación de un fenómeno de subsensibilidad por el uso prolongado de protagonistas dopaminérgicos. Este fenómeno ha sido descrito y confirmado desde un punto de vista neuroquímico,¹⁰⁻¹⁹ aunque hasta ahora no se ha analizado en su aspecto conductal. Al parecer, este fenómeno desaparece cuando se in-

terrompen las inyecciones de DA (aunque después reaparece y se desarrolla con mayor rapidez), y no aparece después del uso de la 6OHDA (aunque sólo se analizaron cinco inyecciones de DA posteriores a la 6)OHDA). Otra observación interesante la constituye el efecto que se notó en el grupo control (NaCl-6OHDA-NaCl) el cual, después de la microinyección de 6OHDA, mostró una reducción patente ($P < 0.01$) de la respuesta en la fase de supresión. Esta observación ya se había descrito en un trabajo previo.¹⁹ Lo cual se interpretó como resultado de hipersensibilidad de denervación, situación que varios autores estudian utilizando bloqueadores sinápticos DA,⁸⁻⁹ bloqueadores de la síntesis de DA,⁴ o bien con el uso de lesiones químicas.⁵ Esta hipótesis parece confirmarse cuando se analizan los datos obtenidos en el grupo DA-6OHDA-DA del presente trabajo, en el cual la acción de la DA siempre fue mucho más importante cuando se aplicó después de la 6OHDA que antes de la misma ($P < 0.01$).

La acción de la DA analizada en este trabajo probablemente está restringida a su efecto intracaudal debido, sobre todo, al tiempo que transcurre entre su aplicación y el efecto conductal observado, tiempo suficiente para su difusión exclusiva en el núcleo caudado.³⁻⁷

Estos cambios de la sensibilidad del receptor dopaminérgico del núcleo caudado, posiblemente un receptor beta,¹⁵ ponen en evidencia el balance muy estricto en cuanto a la disponibilidad del neurotransmisor y a la sensibilidad del receptor, y dan un índice de cómo el receptor es capaz de regular su actividad dependiendo de la mayor cantidad de transmisor químico.²¹ Es probable que en esta regulación, además de los mecanismos postsinápticos, también intervengan presinápticos.⁷ El modelo conductal para el estudio de la acción DA aquí presentado puede ser de utilidad para el estudio de la dinámica de este medidor químico y de otros protagonistas y antagonistas dopaminérgicos. □

Referencias

1. Anlezark, G.M., T.J. Crowt y A.P. Greenway. Impaired learning and decreased cortical norepine-