

Efecto de la aplicación de penicilina cristalina en el núcleo caudado en procesos de comportamiento condicionado en ratas

Mayor M.C. Marco Aurelio **Santiago Avila**,* Sbtte. M.C. Alfonso **Garfias-Arvizu**,**
D. en C. Guillermo **Cobos-Zapíaín**,*** Gral. Bgda. M.C. Jorge **Islas Marroquín******

Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Ciudad de México

RESUMEN. Se estudió el papel que tiene el GABA presente en el núcleo caudado (NC), en la retención de una prueba de prevención pasiva, aplicando de manera bilateral una dosis de penicilina sódica cristalina (500 UI/ μ). La aplicación se llevó a cabo dos minutos después de la fase de adquisición de una tarea de inhibición en una caja de dos compartimientos. Veinticuatro y 48 horas después, se midió la latencia de retención (LR). A las 24 horas, las LR fueron en promedio de 598 ± 3.3 s para el control íntegro (CI) y para el control solución salina (CSS) fue de 505.4 ± 119.5 , mientras que para el grupo experimental (GE) fue de 319 ± 125.6 s. A las 48 horas esta latencia fue de 600 s para el CI y el grupo CSS, mientras que para el GE fue de 25 ± 5.64 s. El procesamiento estadístico demuestra que a las 24 horas, existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo CI y los grupos CSS y GE, este efecto es probablemente secundario al efecto mecánico por la aplicación de la solución salina. A las 48 horas, no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los grupos CI y CSS, pero entre éstos y el grupo GE es significativa ($p < 0.05$), lo que puede estar dado por el disturbio eléctrico producido por la penicilina y que implica que la actividad GABAérgica de alguna manera se encuentra involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria a largo plazo.

Palabras clave: núcleo caudado, aprendizaje, memoria, prevención pasiva, modelo en ratas, penicilina sódica cristalina.

El núcleo caudado (NC) (*Figura 1*) es una parte del sistema extrapiramidal (SEP), que junto con el putamen, forman el núcleo llamado neostriado.⁷

* Originalmente Cap. 1/o. Pasante de medicina. Médico Interno del Hospital Central Militar.

** Estudiante de Doctorado en Biomedicina (Fisiología). Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

*** Profesor de Fisiología Humana. Escuela Médico Militar y Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

**** Director de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

Correspondencia:

Mayor M.C. Marco Aurelio Santiago Avila. Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Hospital Central Militar. Periferico Norte s/n. Col. Lomas de Sotelo, México, D.F. CP 11649.

SUMMARY. The role that GABA plays in the caudate nucleus (NC) was evaluated in a passive avoidance test. A dose of 500 IU of sodic crystalline penicillin was applied in nucleus caudatus two minutes after the acquisition phase of an inhibition task, inside a two-component box. Twenty four and 48 hours later, the retention delay was measured. The retention delay average in first 24 hours was: 598 ± 3.3 s for CI; 505.4 ± 119.5 and 319 ± 125.6 CSS; and GE respectively. In the next 48 hours the delay was: CI = 600 s; CSS = 600 s; GE = 25 ± 5.64 s. In the first 24 hours we found statistical significant difference between the CI group and the CSS and EG groups, this effect was probably subsidiary because the delivery solution (saline solution) had a mass effect. At 48 hours there was no differences statistical significant ($p > 0.05$) between the CI group and CSS, but it was between this groups and the GE. The effect measured, connect in some way, that GABAergic activity are involved in the learning processes and long term memory.

Key words: caudate nucleus, passive avoidance, memory, learning, rat, experimental model, sodic crystalline penicillin.

Además de la gran participación que tiene en la regulación de las funciones motoras (postura dinámica y movimiento voluntario), las evidencias que lo involucran en procesos de aprendizaje y memoria se acumulan día con día.^{1,2,8,12,13} La integridad funcional del NC es necesaria para que se lleve a cabo la fase de adquisición de una tarea, como ha sido demostrado al producirse un deterioro en la capacidad para adquirir una respuesta de prevención activa al estimular eléctricamente al NC,¹⁴ pero que también tiene que ver con la consolidación de una tarea. Lo que hace suponer que el sustrato neuroquímico para ambas fases es diferente.^{4,5}

Por otra parte, es importante la temporalidad del estímulo eléctrico aplicado, así como las características del mismo con respecto a la fase de adquisición. Estímulos proporcionados a través de electrodos implantados en el complejo caudado-

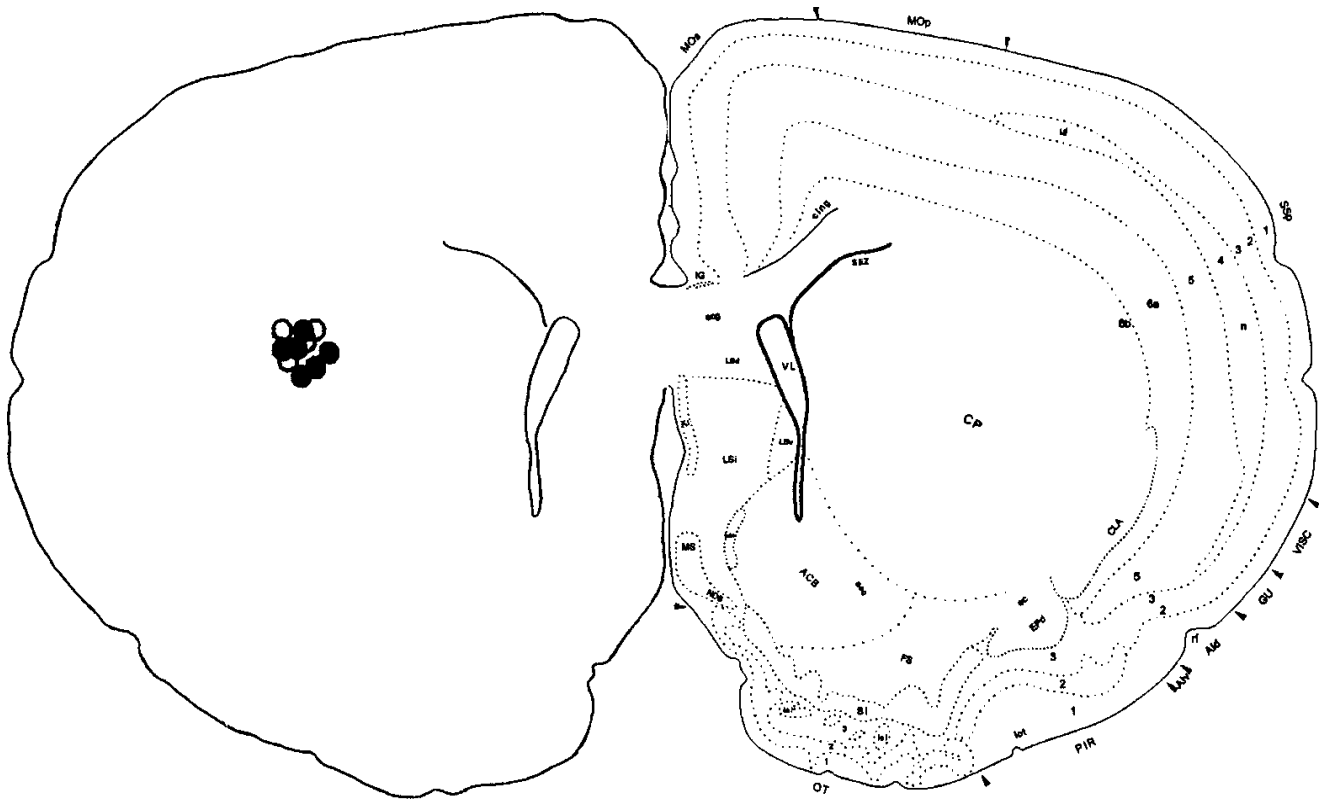


Figura 1. Esquema del cerebro de rata. En este esquema se muestran la ubicación y relación del núcleo caudado-putamen (CP) en un corte sagital del cerebro de rata. VL, ventrículo lateral; C, corteza. Los círculos indican la posición del extremo de las cánulas en los animales del grupo CSS y GE.

putamen aplicados después de recibir el reforzador, retardaron la adquisición del aprendizaje; mientras que estímulos múltiples bloquearon la adquisición del aprendizaje.¹² La perturbación eléctrica del NC con pulsos cortos y únicos, impide la adquisición en ratas que observan a otras ratas realizar una tarea instrumental.⁸

La naturaleza neuroquímica de las distintas conductas, secundaria a los distintos patrones de estimulación es motivo de investigación. Entre los primeros neurotransmisores involucrados en los procesos de memoria y aprendizaje tenemos a la acetilcolina (Aco),^{1,2} la adrenalina (Adr),^{4,5} y a últimas fechas se ha involucrado al GABA.^{3,6,11} Sin embargo, los datos experimentales obtenidos al interferir con la actividad sináptica GABAérgica (agonistas y antagonistas) y su repercusión sobre la consolidación de la memoria, aún son contradictorios.^{3,11}

A pesar de que en los últimos años ha habido un gran avance en el mecanismo de acción a través del cual el GABA ejerce sus efectos sobre el cerebro, se desconoce cual es el papel que juega el GABA en los procesos de aprendizaje y memoria, así como la relación que existe entre éste y otros neurotransmisores también relacionados con dichos procesos (acetilcolina, adrenalina, serotonina). Algunos estudios comienzan a evidenciar los subtipos de receptor a GABA involucrados.¹¹

El propósito del presente trabajo es, aportar más evidencia del efecto de los antagonistas GABAérgicos sobre la retención de una tarea de prevención pasiva, empleando para

ello la penicilina sódica cristalina, ya que desde antiguo se conoce su efecto antiGABA.

Material y métodos

Se utilizaron 18 ratas macho de la raza Wistar, con un peso entre 250-350 g con acceso al alimento y agua a libre demanda. Se integraron tres grupos de seis individuos cada uno, denominados: control íntegro (CI); control solución salina (CSS) y grupo experimental (GE).

A los sujetos del CSS y GE se les implantó de manera bilateral en el NC, cánulas de acero inoxidable (8 mm de largo y 0.5 mm de diámetro) empleando cirugía estereotáxica (Horsley Clark) (coordenadas AB = Bregma; L = -3.0 mm; H = -3.5 mm). Siete días después de los procedimientos quirúrgicos, ya recuperadas las ratas, se sometieron a un paradigma de aprendizaje de prevención pasiva de un ensayo. Los animales de todos los grupos fueron colocados en una caja con dos compartimientos, en uno de ellos el animal permanecía por espacio de 10 seg y se le conoce como compartimiento de seguridad (CS). Transcurrido este tiempo, se abrió una puerta de guillotina y se permitió el paso del animal al segundo compartimiento, registrándose el tiempo que requería en pasar del CS al segundo compartimiento o de castigo (CC) y anotándose como latencia de adquisición (LA), cerrándose entonces la puerta de guillotina. En el CC los animales recibieron una des-

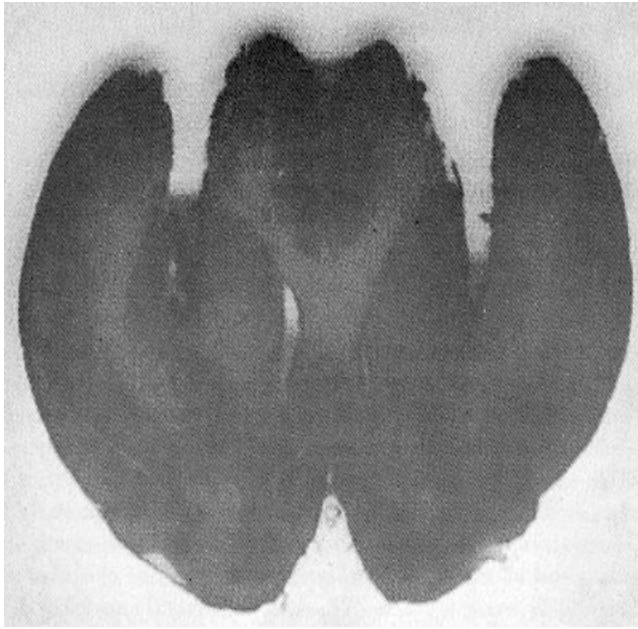


Figura 2. Corte sagital del cerebro de rata. En este corte se muestra el nivel de la lesión producida por la cánula. En todos los animales la posición que en general tuvieron las cánulas colocadas en las ratas se muestra en la figura 1. La tinción es de Nissl. El grosor del corte es de aproximadamente 60 µm.

carga eléctrica en las patas de 500 µA proporcionada con una fuente de corriente (Keithley mod. 220) durante 5 seg. Después de lo cual, se abrió nuevamente la puerta de guillotina y se registró el tiempo que requirieron los animales para pasar al CS (latencia de escape). Veinticuatro horas después, se colocaron los animales nuevamente en el CS por 10 seg y se abrió la puerta de guillotina, y se midió el tiempo en pasar del CS al CC (latencia de retención) lo que se hizo cada 24 horas. Hasta completar 48 horas. El criterio para decir que el animal había aprendido, fue que permaneciera en el CS por un tiempo igual a 600 seg, tras lo cual se daba por concluida la prueba. Para considerar que los animales habían pasado al CC, debían tener las cuatro extremidades sobre el CC.

La inyección de las sustancias se realizó dos minutos después de recibir la fase de adquisición de la tarea inhibitoria. La inyección (1 µl) se realizó a razón de 1 µl/min, dejando la guía de la cánula un minuto más, para permitir la difusión completa de la sustancia aplicada. En todos los casos ambos NC fueron perfundidos, pero siempre se inició con el NC derecho. Al grupo CSS se le aplicó solución salina al 0.9%, al GE se le inyectó 500 UI de penicilina sódica cristalina diluida en agua destilada. Para comprobar la posición de las cánulas, al final de los experimentos, todos los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico. Fueron perfundidos con solución fisiológica intracardiaca y después con solución de formol al 10%, extrayéndose entonces los cerebros, y dejándose en formol (10%) durante 5 días. Luego de los cuales, se procesaron histológicamente mediante la técnica de Nissl. En todos los casos las puntas de las cánulas se encontraron el NC anterodorsal (Figura 2).

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con una $p < 0.05$.

Resultados

Atendiendo a los momentos en que se realizaron las maniobras experimentales y al comportamiento de los animales durante la fase experimental, los resultados se describen en tres fases:

Fase I o latencia de adquisición. En esta fase se registró el tiempo que tardaron los roedores en pasar al compartimiento de castigo. El grupo CI tuvo en promedio 38.4 ± 4.9 seg, mientras que el grupo CSS promedio 17 ± 9.7 seg y el grupo GE tardó $38.4 \pm$ seg. El análisis estadístico de los datos, no mostró diferencia entre grupos ($p < 0.05$), ya que ninguno de los animales había tenido experiencia previa con la prueba de condicionamiento utilizada.

Fase II o latencia de escape. Esta incluye el tiempo que tarda en escapar la rata del CC luego de aplicar el choque eléctrico. En este caso el grupo CI tuvo en promedio 2.8 ± 0.3 seg de latencia; el grupo CSS escapó en 3.1 ± 0.2 seg; y el grupo GE promedió 2.3 ± 1.4 seg de latencia de escape. Al igual que la latencia anterior no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre grupos.

Fase III o latencia de retención de la respuesta inhibitoria. Éste incluye el tiempo que tarda en pasar la rata del CS al CC una vez aplicado el estímulo eléctrico y se registró a las 24 horas y a las 48 horas. Este valor es el que se muestra en la figura 3 e indica que a las 24 horas de aplicado el fármaco, existe diferencia estadísticamente significativa entre las latencias de retención de los grupos CSS y GE, con respecto al grupo CI ($p < 0.05$). Sin embargo, a las 48 horas, el GE pre-

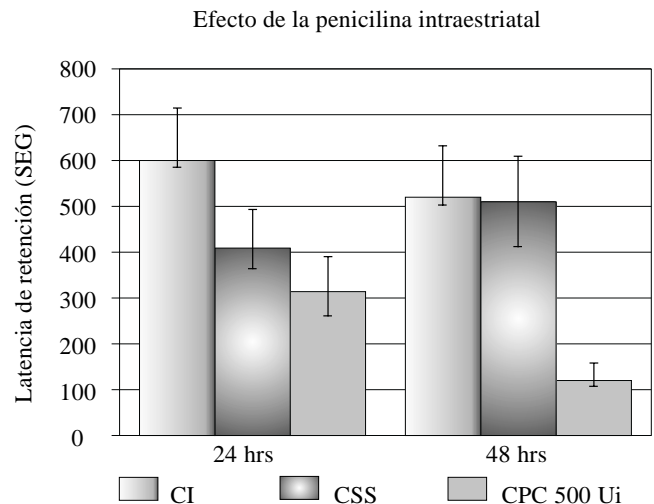


Figura 3. Efecto de la penicilina sobre el aprendizaje. En esta gráfica se puede observar que a las 24 horas, existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en las latencias de retención entre el grupo control íntegro (CI) y los grupos control de solución salina (CSS) y el grupo experimental (GE). En tanto que a las 48 horas ya no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre los grupos CI y CSS, pero sí existe diferencia estadísticamente significativa entre éstos y el GE ($P < 0.05$).

sentó un decremento importante en la latencia de retención, mientras que la latencia de retención del grupo CSS, se recupera a valores similares al del grupo CI. La diferencia entre el grupo GE y los grupos CSS y CI es significativa ($p < 0.05$).

El GE presentó inmediatamente después de la aplicación de la penicilina, conducta de giro hacia el lado en que fue primeramente aplicado el fármaco (NC derecho), para posteriormente presentar convulsiones, durante 3 horas aproximadamente, fenómeno que no fue observado en el CI y en el CSS.

Discusión

Cabe destacar que en este estudio y bajo las condiciones descritas, se logró comprobar, que la penicilina cristalina provoca además de crisis convulsivas (epilepsia experimental), un déficit en la retención de la conducta aprendida ($p < 0.05$). En algunos valores, sobre todo al comparar la retención a 48 horas del GE contra el CI podría pensarse que hay un periodo de tiempo en donde existe una consolidación de la experiencia adquirida (Figura 3). En este caso sería lógico considerar que los cambios sobre los procesos de aprendizaje y de memoria perturbados en las primeras 24 horas y más directamente relacionados con la presencia de convulsiones clínicas, alteran la consolidación del aprendizaje. Pero asimismo, es interesante pensar en un efecto de potenciación acumulativa. Esto es, que la presencia de crisis convulsivas en estas estructuras, podría tener un efecto acumulativo creciente sobre las funciones cognoscitivas y coordinadoras de éstos, provocando con ello que crisis subclínicas posteriores reforzaran la no consolidación mnésica de la respuesta adquirida y no la extinción de ésta.

Fundamentándose en esto y en la realidad de que la base de la comunicación sináptica es la presencia de uno o más neurotransmisores que interactúan, podría empezarse a dilucidar que la penicilina no sólo provoca un efecto de desinhibición sobre los impulsos motores de diversos núcleos controlados por la transmisión GABAérgica, sino que el almacenamiento y registro de aferencias, o inclusive eferencias provenientes de estos centros cerebrales, mediadas por GABA, podrían verse afectados por la presencia de la penicilina en sus receptores.

Islas y cols. en 1983,⁹ describen un efecto paradójico al registrar una mayor retención del conocimiento adquirido; al aplicar a gatos penicilina benzatínica intraestriatal y enseña a condicionarlos en una prueba de prevención pasiva. Los gatos al parecer recordaron durante más tiempo. Parecería que la cronobiología de los eventos también influyera sobre la aparición de respuestas, esto es, que gatos que convulsionan al momento de condicionarse recuerdan más el evento negativo de los choques; y las ratas, que fueron sometidas a éstos y posteriormente al efecto de la penicilina intraestriatal, parecen olvidar aunque no de manera estadísti-

ticamente significativa. Habría que pensar en el componente "emocional" involucrado adjunto a las convulsiones y con ello en otras estructuras relacionadas.¹⁰

Inclusive el manejo y las condiciones de trato individual a cada rata, podrían influir en la retención y evocación de la respuesta, esto significa que factores como violencia, hacinamiento o falta de alimento, podrían perturbar los procesos que subyacen en el aprendizaje y la memoria de la tarea estudiada.

La relación espacio-tiempo-evento, podría ser un juego de combinaciones importantes que nos llevaría a dilucidar diversos mecanismos cronobiológicos en la estructura orgánica del proceso aprendizaje-memoria.

Referencias

1. Brust-Carmona H, Peñaloza-Rojas JH, Chong KG, Grinberg-Zylberbaun J, Prado-Alcalá RA, Zimmerman AR. Efectos de la inyección tópicamente significativa. Habría que pensar en el componente "emocional" involucrado adjunto a las convulsiones y con ello en otras estructuras relacionadas.¹⁰
2. Bermudes-Rattoni F, Velazquez-Martínez DN, Prado-Alcalá RA. Núcleo caudado y aprendizaje VII. Efectos de la microinyección de escopolamina sobre el condicionamiento operante. XIX Congr. Nal. de Ciencias Fisiológicas.
3. Bhattacharya SK, Upadhyay SN, Jaiswal AK, Sen AP. Latency of memory consolidation induced in mice by piracetam, a nootropic agent. Indian J Exp Biol 1993; 31(11): 898-901.
4. Brust-Carmona H, Prado-Alcalá RA, Grinberg-Zylberbaun J, Alvarez-Leefman J, Zarco de Coronado I. Modulatory effects of acetylcholine and catecholamines in the caudate nucleus during motor conditioning. In neurohumoral coding of brain function. Myers and Drucker-Colin (eds) New York, Plenum Press Pub. Co 1974: 171-187.
5. Cruz-Morales SE, Quirarte GL, Diaz del Guante MA, Prado-Alcalá R. Effect of GABA antagonists on inhibitory avoidance. Life Sci 1993; 53(16): 1325-1330.
6. Dubrinova NI, Il'iuchenok Riu. GABA-opioid interaction during the recovery of a passive avoidance conditioned reaction. ZhVyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova 1994; 44(1): 80-84.
7. Ganong FW. Fisiología humana. Editorial el Manual Moderno 15ava Edición.
8. Grinberg-Zylverbaum J, Carranza MB, Cepeda GV, Vale TC. Caudate nucleus stimulation impairs the processes of perceptual integration. Physiol and Behav 1974; 12: 913-918.
9. Islas MJ. (1993). Efectos de la epilepsia experimental en el núcleo caudado sobre condicionamientos instrumentales. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. Tesis de doctorado. Facultad de Medicina UNAM, México. 1993.
10. McGaugh JL, Cahill L, Roozendaal B. Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. Proc Natl Acad Sci USA Colloquium paper 1996; 93: 13508-13514.
11. Olpe HR, Karlsson C, Pozza M, Brugger F, Steinmann M et al. CCP35348. A centrally active blocker of GABA-B receptors. European J Pharmacol 1990; 187: 27-38.
12. Peek HVS, Herz MJ. Caudate nucleus stimulation retroactively impairs complex maze learning in the rat. Science 1971; 173: 80-82.
13. Prado-Alcalá RA, Grinberg-Zylberbaun J, Alvarez-Leefman J, Gomez A, Singer S, Brust-Carmona H. A possible caudate-cholinergic mechanism in two instrumental conditioned responses. Psychopharmacology (berl) 1972; 25: 339-346.
14. Stevens JR, Kim CH, MacLean PD. Stimulation of caudate nucleus: behavioral effects of chemical and electrical stimulation. Arch Neurol 1961; 4: 47-54.