



PARTICIPACIÓN DEL NÚCLEO SEPTAL LATERAL DE RATAS MACHO EN EL EFECTO ANTIDEESESPERANZA Y ANSIOLÍTICO DE LA ALOPREGNANOLONA

Rosa Isela García-Ríos^a, Juan Francisco Rodríguez-Landa^a, Carlos M Contreras^{a,b}.

^a Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México.

^b Unidad Periférica en Xalapa del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Xalapa, Veracruz. México. E-mail: ccontreras@uv.mx

RESUMEN

El núcleo septal lateral es una estructura medial del cerebro anterior implicada en el hedonismo que contiene receptores a neuroesteroides. La administración sistémica del neuroesteroide alopregnanolona, aumenta la actividad neuronal del núcleo septal lateral, a la par que reduce la inmovilidad en la prueba de nado forzado, es decir, produce un efecto antidesesperanza. Por otro lado, algunos neuroesteroides como la progesterona y la alopregnanolona producen efectos ansiolíticos y antidepresivos en modelos experimentales, mediante acciones sobre el receptor GABA_A. A fin de identificar la participación del núcleo septal lateral en estas acciones, evaluamos el efecto de la microinyección *in situ* de alopregnanolona en el núcleo septal lateral de ratas sometidas a la prueba de nado forzado (para evaluar efecto antidesesperanza) y enterramiento defensivo (para evaluar efecto ansiolítico). Utilizamos ratas adultas de la cepa Wistar repartidas en tres grupos experimentales, para evaluar el efecto antidesesperanza y otros tres grupos para evaluar el efecto ansiolítico. En la prueba de nado forzado la microinyección de alopregnanolona alargó significativamente la latencia a la primera inmovilidad y redujo el tiempo total de inmovilidad, sin cambios en la actividad motriz. En la prueba de enterramiento defensivo incrementó la latencia al enterramiento y redujo el tiempo empleado en el enterramiento. Estos datos señalan que núcleo septal lateral participa en las acciones ansiolíticas y antidepresivas de la alopregnanolona a nivel experimental.

1. INTRODUCCIÓN

Cuando las ratas son implantadas con electrodos en el área septal y tienen acceso a aplicarse estímulos eléctricos en esta región, despliegan una alta tasa de autoestimulación intracraneal y prefieren la autoestimulación que al alimento, la actividad sexual o la ingesta de sustancias altamente adictivas; de ahí que a esta área se le identifique como “zona del placer” (Olds y Milner, 1954). Dado que los antidepresivos efectivos clínicamente aumentan la tasa de autoestimulación intracraneal (McCarter y Kokkinidis, 1988) y que uno de los síntomas principales de la depresión es la anhedonia o incapacidad para experimentar placer, es posible suponer alguna disfunción de las porciones del cerebro susceptibles al fenómeno de autoestimulación. En efecto, el núcleo septal lateral participa en la expresión de ansiedad y miedo y su actividad neuronal disminuye cuando los animales anticipan un choque eléctrico en las patas (Yadin y Thomas, 1981) o cuando son sometidos a procedimientos experimentales que inducen desesperanza como la prueba de nado forzado (Contreras et al., 2004). Por el contrario, la tasa de disparo neuronal aumenta cuando los

animales reciben un reforzador positivo como el alimento (Vetulani, 1984; Yadin y Thomas, 1981), o cuando son tratados con diversos fármacos antidepresivos clínicamente eficaces (Contreras et al., 2001) o con neuroesteroides como la alopregnanolona (Rodríguez-Landa et al., 2007).

En el núcleo septal lateral existen interneuronas GABAérgicas que contienen receptores GABA_A, los cuales a su vez, poseen un sitio de reconocimiento para los neuroesteroides como la progesterona y la alopregnanolona (Majewska, 1992). En consistencia, ambos neuroesteroides producen efectos de tipo ansiolítico y antidepresivo en diversos modelos animales (Martínez-Mota et al., 1999; Khisti et al., 2000), por interacción con estos receptores (Khisti et al., 1998, 2000; Rodríguez-Landa et al., 2007), lo cual amerita recibir más observaciones, dado que se trata de sustancias elaboradas por el cerebro y podrían así participar en procesos de recuperación aparentemente espontánea de estados de ansiedad y de depresión.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos experimentales. Se utilizaron 56 ratas macho adultas de la cepa Wistar (300-350 g). Fueron alojados en cajas de acrílico translúcidas en un bioterio con temperatura ambiente y ciclo de luz/oscuridad de 12 x12 horas (ON a las 7:00 AM) y con acceso al agua y alimento *ad libitum*. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (2008).

Para la prueba de nado forzado se utilizaron tres grupos, uno intacto, otro vehículo y otro alopregnanolona (1.0 mg/rata) para determinar alguna acción antidesesperanza. En otros tres grupos con tratamientos semejantes se exploró el efecto ansiolítico en la prueba de enterramiento defensivo. La dosis de alopregnanolona fue seleccionada de estudios previos (Rodríguez-Landa et al., 2009) y fue disuelta en una solución de γ -ciclodextrina al 35 % en agua inyectable. Todos los compuestos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. USA. Bajo anestesia con éter etílico (J. T. Baker), se implantó una cánula guía (9 mm de longitud, 22 G) en el núcleo septal lateral: AP= 0.2 mm, L= 0.5 mm, H= 3.5 mm, (Paxinos y Watson, 1998). Siete días después de la cirugía los animales fueron microinyectados y evaluados en las pruebas conductuales. La microinyección del vehículo o alopregnanolona (0.3 μ l) se realizó con una bomba automática de infusión (KD Scientific). La cánula inyectora, de 10 mm de longitud, sobresalía 1 mm de la cánula guía. La microinyección se realizó a velocidad constante de 0.06 μ l/min y posteriormente, se permitió la difusión de las sustancias durante 5 min. Después, los animales fueron evaluados en las pruebas conductuales.

Prueba de campo abierto. Cada rata fue colocada durante 5 min en una caja de acrílico opaca (44 x 33 x 20 cm), con la base dividida en cuadros de 11 x 11 cm. Se contó el número de cuadros cruzados cuando la rata pasó al menos tres cuartas partes de su cuerpo de un cuadro a otro.

Prueba de nado forzado. Consistió en colocar a la rata en un estanque de vidrio (50 x 35 x 60 cm) con agua a 25° C (\pm 1°C). En una sesión de prueba de 5 min se cuantificó la latencia a la primera inmovilidad (tiempo transcurrido desde que la rata fue colocada en el estanque hasta que ocurrió la primera inmovilidad) y el tiempo total de inmovilidad (suma de los periodos de inmovilidad). La inmovilidad fue definida como todos aquellos periodos mayores a 2 seg en los que la rata tocó el fondo del estanque o cuando se mantuvo a flote sin realizar desplazamientos.

Enterramiento defensivo. Consistió en colocar a la rata durante 10 min en una caja de acrílico (27 x 17 x 15.5 cm) de la que de una de sus paredes sobresalía un electrodo de cobre (90 mm, de largo y 8 mm de diámetro) que liberó una corriente continua de 0.3 mA. El piso de la caja se cubrió con una cama de viruta cuya superficie quedó 1 cm por debajo del electrodo. Se evaluó la latencia al enterramiento (tiempo transcurrido desde que la rata recibe el primer estímulo eléctrico hasta que inicia el enterramiento) y, el tiempo total de enterramiento (suma de los periodos de enterramiento).

Control histológico. Al final de los experimentos, todos los animales fueron anestesiados con éter etílico. Mediante un electrodo (100 μ de diámetro por 10 mm de largo) colocado a través de la cánula guía se pasó corriente directa (30 seg cada polaridad; estimulador GRASS S88) para

marcar el sitio de microinyección por electrocoagulación. 24 horas después, los animales anestesiados letalmente con éter etílico fueron perfundidos por vía intracardiaca con solución salina fisiológica (0.9%) y luego formaldehído al 30% en buffer de fosfatos (0.1 M; pH 7.4). Posteriormente se realizaron cortes de 40 μ M de grosor y fueron teñidos con la técnica de Nissl para identificar el sitio de microinyección con la ayuda del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998). Para el análisis estadístico sólo se incluyeron los datos de las ratas donde se identificó la marca de la cánula guía en el núcleo septal lateral.

Análisis estadístico. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de 1 vía. Cuando se encontraron valores de $p \leq 0.05$, fue aplicada la prueba *post hoc* de Student Newman Keuls. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar.

3. RESULTADOS

La administración de la alopregnanolona no provocó cambios en el número de cuadros cruzados en campo abierto [F (2,21)= 0.139; $p=0.871$, NS] durante los 5 min de la prueba.

La microinyección de alopregnanolona en el núcleo septal lateral alargó significativamente la latencia a la inmovilidad [F (2,21)= 10.692; $p<0.001$] y redujo el tiempo total de inmovilidad [F (2,21)= 23.624; $p<0.001$] en la prueba de nado forzado (Fig. 1).

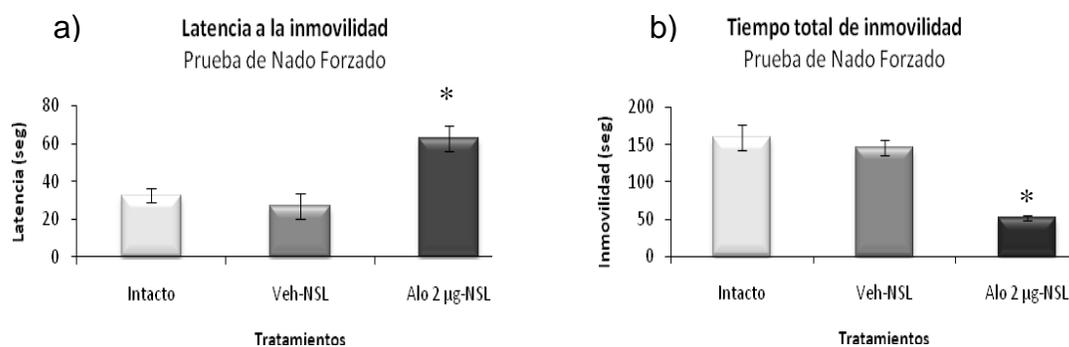


Figura 1. Prueba de nado forzado. La microinyección de alopregnanolona en el núcleo septal lateral alargó la latencia a la primera inmovilidad (a) y redujo el tiempo total de inmovilidad (b). Post hoc de Student Newman Keuls. * $p < 0.05$ vs intacto y Veh, ANOVA de una vía. Veh: vehículo; Alo: alopregnanolona.

En la prueba de enterramiento defensivo, la microinyección de alopregnanolona en el núcleo septal lateral incrementó significativamente la latencia al enterramiento [F (2,20)= 13.188; $p<0.001$] y redujo significativamente el tiempo de enterramiento [F (2,20)= 5.582; $p=0.012$] (Fig. 2). Mientras que, en la prueba de campo abierto no produjo cambios significativos [F (2,20)= 2.660; $p=0.095$, NS] en el número de cuadros cruzados: intacto (33.6 ± 2.6), Veh-NSL (40.1 ± 4.7) y Alo-NSL (26.6 ± 4.6) (Fig. 2).

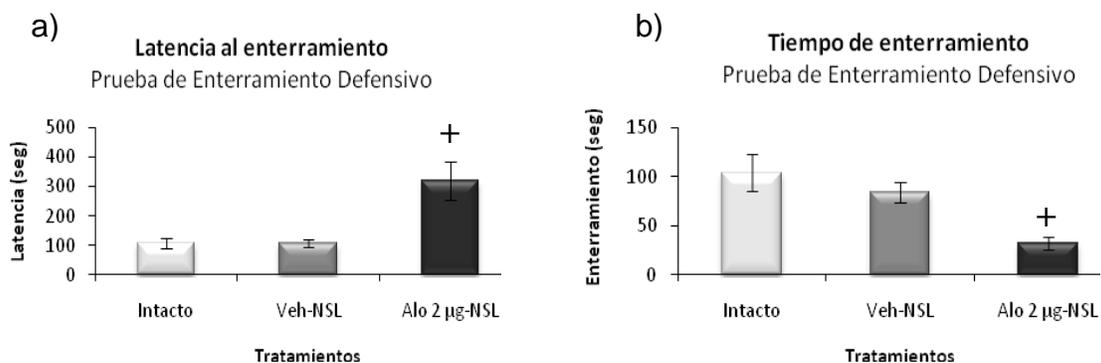


Figura 2. Prueba de enterramiento defensivo. La microinyección de alopregnanolona en el núcleo septal lateral incrementó significativamente la latencia al enterramiento (a) y redujo el tiempo total de enterramiento (b). + $p < 0.05$ vs intacto y Vehículo. ANOVA de una vía. Post hoc de Student Newman Keuls.

4. DISCUSIÓN

En el modelo de nado forzado (Porsolt et al., 1978), la latencia al primer periodo de inmovilidad indica el primer esfuerzo que la rata realiza para tratar de encontrar una salida del estanque (Contreras et al., 1995; Espejo y Miñano 1999), mientras que, la inmovilidad representa la falta de motivación de las ratas para resolver la situación aversiva, por lo que un decremento en la latencia a la inmovilidad y un incremento en el tiempo de inmovilidad, se interpreta como un estado de desesperanza, dichas alteraciones son revertidas por antidepresivos clínicamente efectivos, como la fluoxetina (Contreras et al., 2001), así como la misma alopregnanolona en ratones (Khisti et al., 2000; Khisti y Chopde, 2000) o en ratas (Rodríguez-Landa et al., 2007, 2009). Por lo tanto, cuando una sustancia disminuye la inmovilidad e incrementa la latencia al primer periodo de inmovilidad, sin producir cambios en la actividad locomotriz generalizada, se interpreta como un efecto antidepresivo. En nuestro estudio, la microinyección de alopregnanolona en el núcleo septal lateral, incrementó la latencia a la inmovilidad y redujo la inmovilidad de las ratas forzadas a nadar, lo que se interpreta como un efecto antidesesperanza.

Por otra parte, en la prueba de enterramiento defensivo, la latencia al enterramiento es un indicador de la reactividad del animal ante el estímulo aversivo, un umbral de respuesta (Pinel y Treit, 1978; De Boer y Koolhaas, 2003), mientras que el incremento en el tiempo de enterramiento es un indicador de la ansiedad (Pinel y Treit, 1978; De Boer y Koolhaas, 2003), tal incremento se revierte con fármacos ansiolíticos como el diazepam o con la misma alopregnanolona administrada de manera sistémica (Fernández-Guasti y Picazo, 1995). En nuestro estudio, la microinyección de alopregnanolona en el núcleo septal lateral aumentó la latencia al enterramiento y disminuyó el tiempo de enterramiento, sin cambios en la actividad locomotriz, lo que se interpreta como un efecto ansiolítico a nivel experimental (Pinel y Treit, 1978; De Boer y Koolhaas, 2003), pero ubicamos al núcleo septal lateral como uno de los sitios de acción.

5. CONCLUSIÓN

El núcleo septal lateral participa en el efecto antidepresivo en la prueba de nado forzado y ansiolítico en la prueba de enterramiento defensivo producido por la administración *in situ* de la alopregnanolona.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó durante el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT). Proyecto CB-2006-1, 61741. Rosa Isela García-Ríos recibió una beca del CONACyT para estudios de doctorado, Reg. 203280.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Fernandez-Guasti, O. Picazo "Flumazenil blocks the anxiolytic action of allopregnanolone". *Eur. J. Pharmacol.*, Vol. 281, 1995, pp.113–115.
2. B.D. McCarter, L. Kokkinidis "The effects of long-term administration of antidepressant drugs on intracranial self-stimulation responding in rats", *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Vol. 31, 2, 1988, pp. 243-247.
3. C.M. Contreras, D. Beltrán, M. Saavedra, M. Molina "The combination of several antidepressants is not synergistic on the firing of lateral septal neurons in the rat", *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.*, Vol. 19, 7, 1995, pp. 1157-1162.
4. C.M. Contreras, J.F. Rodríguez-Landa, A.G. Gutiérrez-García, B. Bernal-Morales "The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurons in the rat", *J. Psychopharmacol.*, Vol. 15, 2001, pp. 231– 236.
5. C.M. Contreras, L. Chacón, J.F. Rodríguez-Landa, B. Bernal-Morales, A.G. Gutiérrez-García, M. Saavedra "Spontaneous firing rate of lateral septal neurons decreases after forced swimming test in Wistar rat". *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.*, Vol. 28, 2, 2004, pp.343-348.
6. C.M. Contreras, M.L. Marván, V. Alcalá-Herrera, M.A. Guzmán-Sáenz "Chronic clomipramine increases firing rate in the lateral septal nuclei of the rat", *Physiol. Behav.*, Vol. 48, 4, 1990, pp. 551-554.
7. C.M. Contreras, V. Alcalá-Herrera, M.L. Marván "Action of antidepressants on the septal nuclei of the rat", *Physiol. Behav.*, Vol. 46, 1989, pp. 793–798.
8. E. Yadin, E. Thomas "Septal correlates of conditioned inhibition and excitation in rats", *J. Comp. Physiol. Psychol.*, Vol. 95, 2, 1981, pp. 331-340.
9. E.F. Espejo, F.J. Miñano "Prefrontocortical dopamine depletion induces antidepressant-like effects in rats and alters the profile of desipramine during Porsolt's test". *Neuroscience*, Vol. 88, 1999, pp. 609–615.
10. G. Paxinos, C. Watson, "The rat brain in stereotaxic coordinates". (Academic Press, San Diego, California, USA, 1998), fig. 17.
11. J. Olds, P. Milner "Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain", *J. Comp. Physiol.*, Vol. 47, 1, 1954, pp. 419-427.
12. J. Vetulani "Complex action of antidepressant treatment on central adrenergic system: possible relevance to clinical effects", *Pharmacopsychiatry*, Vol. 17, 1984, pp.16-21.
13. J.F. Rodríguez-Landa, C.M. Contreras, B. Bernal-Morales, A.G. Gutiérrez-García, M. Saavedra "Allopregnanolone reduces immobility in forced swimming test and increases firing rate of lateral septal neurons through actions on GABA_A receptor in the rat", *J. Psychopharmacol.*, Vol. 21, 1, 2007, pp. 76-84.
14. J.F. Rodríguez-Landa, C.M. Contreras, R.I. García-Ríos "Allopregnanolone microinjected into the lateral septum or dorsal hippocampus reduces immobility in the forced swim test: participation of the GABA_A receptor", *Behav. Pharmacol.*, Vol. 20, 7, 2009, pp. 614-622.
15. J.P.J. Pinel, D. Treit "Burying as a defensive response in rats". *J. Comp. Physiol. Psychol.* Vol. 92, 1978, pp.708–712.
16. L. Martínez-Mota, C.M. Contreras, M. Saavedra "Progesterone reduces immobility in rats forced to swim". *Arch. Med. Res.*, Vol. 30, 4, 1999, pp.286-289.
17. M. D. Majewska "Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA receptor. Mechanism of action and physiological significance". *Prog. Neurobiol.*, Vol. 38, 1992, pp. 379-395.

- 18.R. D. Porsolt, A Bertin, M. Jalfre "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants". *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, Vol. 229, 2, 1977b, pp. 327-336.
- 19.R. D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, M. Jalfre "Behavioral despair in rats: a new animal model sensitive to antidepressant treatment". *Eur. J. Pharmacol.*, Vol. 47, 1978, pp.379-391.
- 20.R. D. Porsolt, L. M. Pichon, M. Jalfre "Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment". *Nature*, Vol. 266, 1977a, pp. 730-732.
- 21.R.T. Khisti, C.T. Chopde "Serotonergic agents modulate antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in mice". *Brain Res.*, Vol. 865, 2, 2000, pp.291-300.
- 22.R.T. Khisti, C.T. Chopde, S.P. Janis "Antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in mice forced swim test". *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Vol. 67, 2000, pp.137-143.
- 23.R.T. Khisti, S.N. Mandhane, C.T. Chopde "The neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one induces catalepsy in mice". *Neurosci. Lett.*, Vol. 251, 2, 1998, pp.85-88.
- 24.S.F. De Boer J.M. Koolhaas "Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology", *Eur. J. Pharmacol.*, Vol. 463, 1-3, 2003, pp.145-161.