

Influencia del Destete temprano en un Modelo Animal con Ratas Wistar adultas

Marcos Ojea Quintana^a & Pablo Argibay

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental
Hospital Italiano de Buenos Aires

Introducción

Un evento traumático se define como una experiencia amenazante para uno mismo o para una persona cercana, acompañada de miedo intenso, terror y/o desesperación¹. En este sentido, el desorden por estrés post traumático (PTSD, en inglés) implica toda una serie de trastornos neurobiológicos y distorsiones cognitivas que alteran las respuestas conductuales del individuo, suponiendo un altísimo déficit para la calidad de vida del hombre^{1,2}. El “trauma temprano” será entonces un evento de horror intenso en las etapas iniciales del desarrollo de un individuo, que potencialmente puede condicionar su vida adulta. Desde el punto de vista de la arquitectura cerebral, el periodo de la infancia es un momento en el que la plasticidad del cerebro hace a este altamente vulnerable a los estímulos del medio. La vulnerabilidad se manifiesta a todos los niveles; es tanto fisiológica como psicológica y social³.

El destete temprano (DT) en ratas ha demostrado ser una experiencia traumática si bien carece en tanto que no podemos observarlo de la característica subjetiva de “terrorífico”, si es cierto que altera las resistencias orgánicas del animal aumentando la vulnerabilidad frente a distintas enfermedades^{3,4}. Las consecuencias fisiopatológicas del DT se presentan en una predisposición a contraer diabetes, úlceras gástricas^{4,5} y el deterioro de las resistencias contra el cáncer^{3,6}. Esta privación materna durante los primeros días del periodo neonatal en los roedores significa la pérdida de los cuidados primarios intensos necesarios para el desarrollo normal. Hay evidencias que muestran que frente a un trauma temprano, el sistema nervioso autónomo aumenta la respuesta endocrina frente a los estresores del medio². En el comportamiento *post trauma* puede verse una disminución en la motivación, expresada por la disminución del juego agresivo intragrupal normal en el periodo juvenil⁷.

En general en psicología experimental se utilizan diversos modelos para evaluar el efecto de situaciones ambientales, fármacos y componentes genéticos. Tres modelos muy utilizados son la “Natación forzada” (NF) de Porsolt⁸, el “Laberinto elevado en cruz” (LEC) y el “Ambiente Enriquecido” (AE).

El modelo de “Natación forzada” desarrollado por Porsolt en 1977, es utilizado para evaluar la actividad de psicofármacos sobre conductas depressive-like inducidas de diversas maneras.

^a Contacto: marcos.ojea@salvador.edu.ar

El modelo de ambiente enriquecido (AE) es de gran efectividad por su amplia gama de efectos a largo plazo en la neuroanatomía, neuroquímica y en la conducta del animal⁹. A nivel comportamental, se ve un mejor desempeño en tareas de aprendizaje. A nivel bioquímico hay un aumento de la neurogénesis¹⁰ y protección por expresión de factores de crecimiento. Estructuralmente o en el nivel neuroanatómico se ven aumentos de arborización dendrítica en el hipocampo y otras regiones del cerebro. Este modelo resulta interesante para evaluar la posibilidad de revertir los efectos de ansiedad generados por un trauma temprano.

Uno de los mejores modelos para evaluar grados de ansiedad es el laberinto elevado en cruz. Bajo la **hipótesis de trabajo** de que el DT es un estresor de suficiente intensidad como para alterar pruebas comportamentales del adulto; **el objetivo** de este trabajo es evaluar el aspecto comportamental de un animal adulto con un trauma temprano (DT), a través de los modelos mencionados de NF y LEC.

Como objetivo secundario buscamos evaluar el impacto del trauma temprano, vinculado o no, a un trauma adulto y el efecto del AE, sobre la expresión de genes asociados a la neurogenesis¹¹ y a los sistemas endocrino e inmune en el hipocampo del cerebro de la rata. En estas estructuras se producen los desarreglos provocados por las experiencias traumáticas. Las consecuencias pueden verse a nivel molecular, ya que las desregulaciones provocan alteraciones en el metabolismo y el sistema inmune. Nuestros genes de estudio: los receptores de glucocorticoides y de mineralocorticoides, así como las citoquinas IL-6, IL-1a IL-1b y TNF- α (aunque hay muchos mas) están encargados de mediar la respuesta frente a heridas, infecciones y otros tipos de stress orgánico. Valores elevados de la concentración de estas citoquinas estarían presentes en individuos con patologías de estrés crónico y depresión mayor¹². Hay nuevos trabajos que reportan haber encontrado valores altos de un amplio espectro de citoquinas pro inflamatorias también en trastornos de ansiedad, PTSD y ataques de pánico^{2,13}. Por otra parte, se encontró que la concentración de BDNF estaba afectada en el hipocampo de ratas sometidas a estrés¹⁴. BDNF es una neurotrofina importante involucrada en la regulación del crecimiento y reparación neuronal, la plasticidad y conectividad sináptica. Tiene una importancia central en los procesos neurogenéticos.

Por lo tanto, estos genes involucrados en la biología molecular del estrés nos podrían dar información sobre el impacto del DT en el cerebro de ratas adultas expuestas a altos niveles de estrés; y si la estimulación de la neurogénesis durante el periodo de AE podría llegar a revertir las alteraciones producidas por el estrés adulto.

Materiales y métodos

Animales.

Se usaran ratas Wistar desde el nacimiento hasta los 9 meses, provenientes del Bioterio del ICBME. Contando con un n total de 40 ratas, las dividiremos en dos 2 grupos con destete temprano (G1 y G3) y dos grupos control (G2 y G4). El G2, estará libre de DT, pero pasara por el NF y el AE, para contrastar con el G1. El G4 estará libre de DT, NF y AE, contrastando de esta manera con el resto de los grupos, dando la posibilidad de arrojar valores puros de

presencia/ausencia de ansiedad generalizada en el LEC y los valores de grupo normal estándar de la expresión de los genes relacionados al estrés.

Cada grupo estará constituido por 5 hembras y 5 machos. Se las provee de agua y comida *ad libitum*, y se las mantiene a temperatura (19-23°) y humedad (45-55%) constante, en un ciclo de luz oscuridad de 12/12 hs, la luz se enciende a las 8:00 AM.

Se respetan los principios éticos de investigación con animales.

- *Procedimiento de Destete.*

El destete temprano se realiza a los 15 días de nacidos los animales, los cuales se agrupan por género en grupos de a 5 con las mismas condiciones ambientales ya mencionadas, en cajas de 425 x 266 x 185 mm.

Tests conductuales

Se someterá tanto al G1, al G2 y al G3 al modelo de depresión de “**natación forzada**” cuando los animales tengan cuatro meses de edad.

El G1 y el G2 serán puestos en un “**Ambiente enriquecido**” durante 15 días a los 7 meses de edad. Finalmente se usará el modelo “**laberinto elevado en cruz**” que se le administrará a los 4 grupos a los 8 meses de edad.

- *Natacion forzada.*

En 1977 Porsolt *et. al.* desarrollan un modelo para el estudio de la depresión usando un cilindro con agua de 40 cm. x 18 cm. (altura/longitud) donde se introduce al animal, sin posibilidades de escapar. Luego de un período de movimiento vigoroso, el animal se acomoda en una postura inmóvil, dejando la cabeza fuera del agua como para respirar. Esta inmovilidad representa un estado de depresión y desesperación que puede ser revertida mediante un tratamiento con antidepresivos. Cada animal permanecerá 15 minutos en el agua (Temp.: 25°) y luego otros 15 minutos en un ambiente a 32° para secarse antes de volver a su jaula. Se entiende como un momento altamente ansiogeno, que usaremos en nuestro experimento como el segundo estresor del modelo. La inmovilidad esta definida como el periodo en el que el roedor solo hace los movimientos necesarios para mantener la cabeza sobre el nivel del agua⁹ y no hace intentos para escapar (Ej.: swimming, paddling, climbing, diving). Estos intentos de escape o conductas activas (específicamente el *climbing* y el *swimming*) fueron susceptibles a tratamientos con fármacos, y se reconocieron los neurotransmisores mediadores. Esto indicaría que las conductas activas de la NF son factibles de ser cuantificadas¹⁵. Esta cuantificación de las 5 distintas posturas están estandarizadas en la bibliografía^{8,16,17,18}

- *Laberinto elevado en cruz*

Es un artefacto que está elevado alrededor de un metro del suelo y tiene cuatro brazos que parten del centro. Dos brazos están cubiertos por paredes de aprox. 50 cm. de altura y los otros dos son brazos abiertos, o con paredes muy pequeñas. Cada animal es puesto en el centro del aparato y se lo deja por 5 minutos. Un conjunto de sensores de movimiento registran las entradas y salidas de cada uno de los brazos y el tiempo de permanencia tanto en los brazos como en el centro. Este modelo mide la ansiedad en el sentido exploratorio, un rendimiento bajo indicaría la inhibición de esta conducta.

Modelo ambiental

- *Ambiente enriquecido*

Son dos Jaulas de metal (40x50x100cm) con estantes a distintas alturas y varios elementos en su interior (juguetes, ruedas, túneles, etc.). Agua y alimento *ad libitum*, además de varios tipos de alimentos disponibles (galletitas, etc.). El cambio de los elementos de estimulación se hace día por medio.

Análisis de la biología molecular

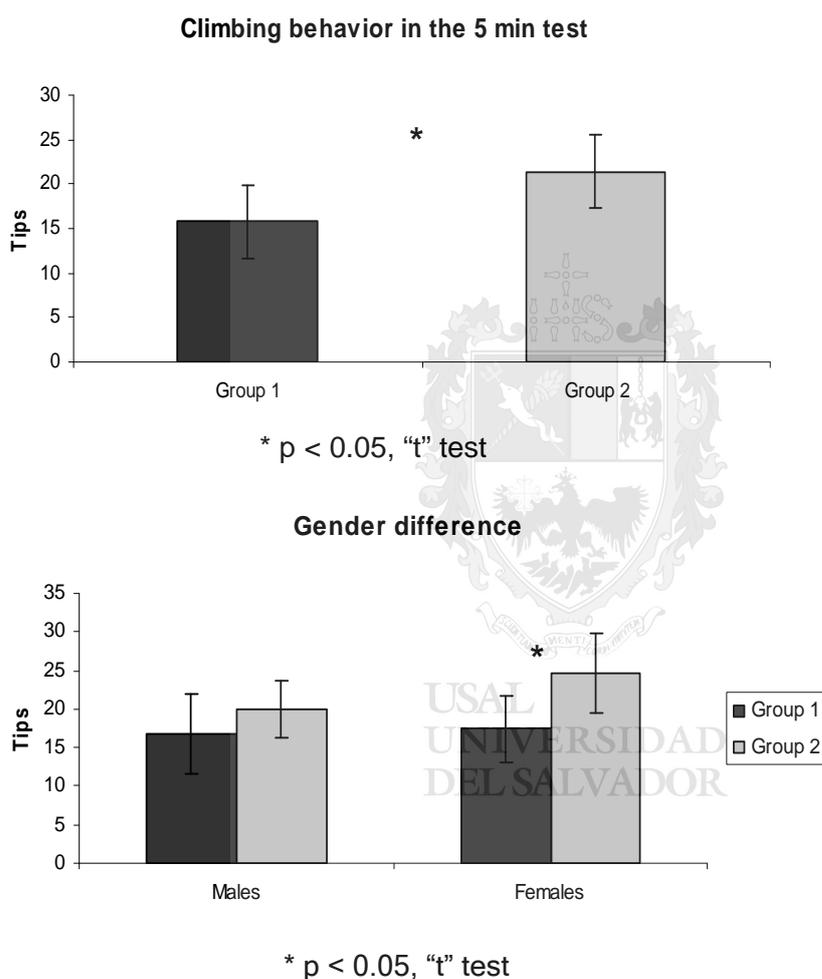
El ARN del cual se analiza la expresión diferencial de los genes: BDNF; los receptores de glucocorticoides (GR), de mineralocorticoides (MR); y las citoquinas IL-6, IL-1a IL-1b, TNF- α con sus receptores IL-6R, IL1-R1 y TNF- α R se obtiene del tejido nervioso del hipocampo, cerebelo y de la corteza cerebral. El método de eutanasia para la obtención del cerebro se hizo por decapitación con guillotina. Los animales estaban anestesiados con Sevoflorane. Se respetaron las normas AVMA (Asociación americana de medicina veterinaria, Ed. Junio 2007).

Análisis Estadístico

En todos los casos se efectuara estadística descriptiva (medias, medianas, rangos, desvíos estándares) y estadística inferencial (diferencias entre las muestras, a través de prueba de "t" y un análisis operativo de la varianza) Se establecerá un nivel de significación estadística de $\alpha < 0,05$ con un $\beta = 0,2$. Debido a la novedad de los experimentos planteados no tenemos datos previos como para predecir resultados en que basar el tamaño de la muestra. Sin embargo, esperando una variación entre las medias de un 20% con una variación en el desvío menor a 10%, calculamos que con seis animales en cada grupo estaríamos en un tamaño de muestra adecuado estadísticamente.

Resultados preliminares

Encontramos diferencias de significación estadística en la conducta *climbing* en el FST, entre el grupo 1 (con DT) y el grupo 2 (control): $G1 = 15,8 \pm 4,15$ vs. $G2 = 21,4 \pm 4,14$, $p < 0.05$ "t" test. La diferencia mas notable fue de genero, donde las hembras con DT marcaron mas bajo que las hembras controles al punto de separarse estadísticamente entre si: $HG1 = 17,4 \pm 4,39$ vs. $HG2 = 24,6 \pm 5,12$, $p < 0.05$ "t" test. Concuerda esto con lo establecido en la bibliografía, sobre la evidencia de una mayor incidencia de PTSD en mujeres^{2,18}.



El experimento con el EPM arrojó resultados sin significación alguna, hay que aclarar en este punto que el aparato con el que contábamos en el momento de hacer el experimento tenía unos sensores de movimiento (15cm x 8cm x 10 cm.) atornillados a cada lado de los brazos abiertos. Este tipo de diseño resultó ser defectuoso en tanto que los animales podían subirse encima de los sensores, con lo cual falló la cuantificación de entradas a los brazos abiertos. Aun así, contamos con las posibilidades que puedan arrojar el análisis molecular de interleuquinas y el factor de neurocrecimiento que serán llevadas a cabo en el futuro más próximo. La expresión molecular se estudia por medio de la técnica de PCR en tiempo real.

En definitiva, se puede leer la expresión por dualidad: excitación o inhibición. A partir de las diferencias que presenten los resultados podremos dar cuenta de presencia o ausencia de PTSD en nuestros grupos de estudio comparándolos con los valores arrojados por los grupos control, y de acuerdo a lo establecido en la bibliografía sobre los genes involucrados en la neurobiología de esta problemática².

Financiación del proyecto

Fundación para el desarrollo de las ciencias básicas - ICBME

Agradecimientos

A la Lic. Sabrina Bassi^a por su ayuda en la obtención de tejido nervioso de los animales, y a la Lic. Carol Fagundez^b por su asistencia en las técnicas de biología molecular. Al Dr. Pablo Argibay² por su confianza y apoyo incondicional.

^a Becaria de investigación del ICBME

^b Director del ICBME

Bibliografía

- 
- [1] DSM IV, 1997.
- [2] Heim C, Nemeroff CB. "Neurobiology of posttraumatic Stress Disorder". *CNS Spectr.* 2009 Jan;14(1 Suppl 1):13-24.
- [3] Ader, R and Friedman, SB. "Social factors affecting emotionally and resistance to disease in animals". *V. Psychosomatic Med* 27: 119-122, 1965.
- [4] Greenberg D. and Ackerman S.H. "Reduced fat stores after early weaning: A correlate of vulnerability to stress ulcers". *USA Physiology & Behavior, Volume 38, Issue 3, 1986, Pages 375-379.*
- [5] Ackerman, SH. "Premature weaning, thermoregulation, and the occurrence of gastric pathology". *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 1981; 59:67-86.
- [6] LaBarba RC, White JL. "Maternal deprivation and the response to Ehrlich carcinoma in BALB-c mice". *Psychosom Med* 1971; 33:458-60.
- [7] Shimozuru M, Kodama Y, Iwasa T, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. "Early Weaning Decreases Play-Fighting Behavior during the Postweaning Developmental Period of Wistar Rats" *dev psychobiol* 2007 49 4 343-50.
- [8] Roger D. Porsolt, Guy Anton, Nadine Blavet and Maurice Jalfre. "Behavioral Despair in Rats: A new model sensitive to antidepressant treatments". *European Journal of Pharmacology, 47 (1978) 379--391 © Elsevier/North-Holland Biomedical Press.*
- [9] Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang Y, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien J, Hu Y. "Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain" *PNAS (2000) vol. 97 n° 23:12880-12884.*

- [10] Segovia G, Yague AG, Garcia-Verdugo JM, Mora F. "Environmental Enrichment promotes neurogenesis and changes extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats". *Brain Res Bull* (2006) 70:8-14.
- [11] Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH. "Environmental influences on brain neurotrophins in rats." *Pharmacol Biochem Behav.* 2002 Aug; 73(1):167-75. Review.
- [12] Maes M, Yirmiya R, Norberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G, Kubera M, Bob P, Lerer B, Maj M. "The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression" *Metab. Brain Dis.* (2009) 24:27-53.
- [13] Hoge EA, Brandstetter K, Moshier S, Pollack MH, Wong KK, Simon NM "Broad Spectrum of Cytokine Abnormalities in Panic Disorder and Posttraumatic Stress Disorder" *Depression and Anxiety* (2009) 26 : 447-455.
- [14] Duman RS, Monteggia LM. "A neurotrophic model for stress-related mood disorders." *Biological psychiatry* 2006; 59:1116-27
- [15] Taghzouti K, Lamarque S, Kharouby M, Simon H. "Interindividual Differences in Active and Passive Behaviors in the Forced-Swimming Test: Implications for Animal Models of Psychopathology" *Biol. Psychiatry* (1999);45:750-758.
- [16] Lino-de-Oliveira C, C.M. De Lima T, de P'adua Carobrez A. "Structure of the rat behaviour in the forced swimming test" *Behavioural Brain Research* 158 (2005) 243-250.
- [17] Detke M, Rickels M, Lucki I. "Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants" *Psychopharmacology* (1995) 121 : 66-72.
- [18] Becker JB, Monteggia LM, Perrot-Sinal TS, et. al. "Stress and disease: is being female a predisposing factor?" *J Neurosci.* 2007;27:11851-11855.