

LA ESTIMULACIÓN GABAÉRGICA DEL NÚCELO SEPTAL LATERAL DEL CEREBRO DE RATAS MACHO INCREMENTA LA RESPUESTA AGRESIVA FRENTE A ESTÍMULOS NEUTROS

Federico Nanfaro¹, Vanesa Bazzocchini^{1,2}, Adriana Vega¹, Fernando Giuliani¹, Miriam Laconi¹, Sebastián Casas², Carla Escudero¹, Ricardo Cabrera^{1,2}, Roberto Yunes¹.

¹Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo (IMBECU-FCM, CONICET), ² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Mendoza, Mendoza - Argentina

Palabras clave: agresión, núcleo septal lateral, síndrome septal, GABA

Contacto: Dr. Roberto Yunes, Área de Farmacología. Av. Libertador 80. Centro Universitario. (5500) Mendoza. Argentina. Casilla de Correo 33 (5500) Mendoza. Tel: 054-0261-4494046 - Fax: 054-0261-4494047.

E-mail-address: ryunes@fcm.uncu.edu.ar

RESUMEN

El núcleo septal lateral forma parte de estructuras subcorticales del cerebro. La destrucción de dicho núcleo genera lo que se conoce como síndrome de furia septal. En este trabajo demostramos que el agonista GABAérgico muscimol, en dosis no sedativas, indujo una "inhibición del miedo" en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, asociada a un aumento de respuestas agresivas a objetos habitualmente neutros. Estos resultados, sumados al hecho de que el núcleo septal lateral participa en diversas entidades psiquiátricas, hace que sea interesante aportar al conocimiento de su función apelando a moduladores que se sabe están presentes en el en dicha estructura del sistema nervioso central.

ABSTRACT

Destruction of lateral septum –a nucleus located in subcortical regions of the anterior brain– has been related to an entity known as rage septal syndrome. In the present paper we demonstrate that the direct GABAergic agonist muscimol produces “fear inhibition” when tested at non-sedative doses in Sprague-Dawley male rats. This phenomenon is also supported by an increase of aggressive behaviors directed to otherwise neutral objects. Since the septal lateral has been involved in several psychiatric diseases, it appears as potentially interesting to contribute to the knowledge of its function by taking advantage of eventual modulators known to be present in the nucleus.

INTRODUCCIÓN

La disfunción de diversas regiones encefálicas –corteza cerebral, sistema límbico, núcleos grises de la base– se asocia a cambios en el comportamiento agresivo y a la calidad de la experiencia emocional vinculada a dichos cambios. Por ejemplo, el daño a nivel de amígdala suele vincularse a cambios emocionales tales como enojo, temor y, en ocasiones, verdaderos episodios de furia (1). Adicionalmente, es sabido que el daño en la región septal es responsable de cuadros agresivos de extrema violencia, bien caracterizados en animales de laboratorio (1,2,3). Aunque existen reportes de la acción de algunos compuestos sobre este estado de extrema agitación, por ejemplo la participación de dopamina (2,4), citoquinas (2,4,5), interleuquinas (6), entre otras, poco es lo que se sabe cuando se trata de aspectos detallados relativos a los denominados núcleos septales, salvo el aumento de comportamientos muricidas por

ratas tratadas con agonistas GABAérgicos (7), y en general la participación de receptores GABA en comportamiento agresivo escalonado (8), esto es, comportamientos que dejan de resultar adaptativos en términos evolutivos al alcanzar un nivel inaceptable de expresión.

Los núcleos septales son estructuras que se encuentran en la región medial anteroventral de los hemisferios cerebrales. Entre su población celular se encuentran neuronas de tamaño intermedio agrupadas en los grupos medial, lateral y posterior (9). Reciben todos ellos diferentes aferencias, al tiempo que proyectan eferencias a diversas estructuras cerebrales. En el caso del núcleo septal lateral, recibe aferencias glutamatérgicas del hipocampo, entre otras –por ejemplo corteza perirrinal–, y envía aferencias a tálamo, hipotálamo y núcleo septal medial,

En este trabajo hemos examinado, dada la existencia de una marcada cantidad de cuerpos neuronales GABAérgicos en el núcleo septal lateral (NSL) de la rata (10), el efecto del agonista directo GABA_A muscimol administrado intranuclearmente, sobre el comportamiento agresivo frente a la exposición de los sujetos a un estímulo afectivo neutro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales:

Utilizamos ratas macho de nuestro bioterio, de la cepa Sprague-Dawley (adultos de 70-90 días de edad, de 280-350 gs. de peso), agrupados a razón de 3 animales por caja. Posterior a la cirugía estereotáxica se los alojó en cajas individuales hasta su completa recuperación. Las condiciones de mantenimiento fueron las siguientes: temperatura (22+/- 1°C) y ciclo luz-oscuridad (12/12 luz/oscuridad) constantes, con

acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los estudios comportamentales se llevaron a cabo entre las 12:00 y las 14:00 hs. El manejo de los sujetos experimentales se realizó de acuerdo a los estándares de los Institutos Nacionales de la Salud (National Institutes of Health, USA) para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Reactivos:

Salvo expresa mención en sentido contrario, compramos todos los reactivos a la firma Sigma (St. Louis, MO, USA). Disolvimos el agonista GABA_A muscimol en solución salina estéril, de modo tal de obtener una concentración 0.5 µg/µL. Los animales controles, por su parte, solamente recibieron la solución salina estéril.

Procedimientos quirúrgicos y tratamientos:

Canulamos a los sujetos experimentales unilateralmente en NSL derecho en un marco estereotáxico (David Kopf, USA). Las coordenadas que empleamos pertenecen al Atlas de Pellegrino (1979) (a partir de bregma como referencia, AP +1.8 mm; L +/- 0.3 mm; P -3.7 mm), y realizamos la anestesia con hidrato de cloral (Anedra, Argentina) disuelto en solución salina (NaCl 0.9%) (200 mg/kg i.p.) Las cánulas fueron fijadas al cráneo con cemento dental reforzado por un tornillo de acero inoxidable. Al completar la cirugía a las cánulas les colocamos un mandril de acero inoxidable para evitar que se obstruyeran. Para prevenir infecciones todos los animales recibieron una inyección IM de 0,2ml de penicilina G benzatínica (Richet, Buenos Aires, Argentina). La recuperación espontánea de los sujetos experimentales ocurrió en un plazo de 3-4 días. Establecimos los siguientes grupos: 1) animales control: solamente recibieron el vehículo en NSL, en un volumen similar a los animales experimentales; 2) experimentales, antes y después de la administración de muscimol. Estos animales recibieron muscimol en solución salina, en un volumen de 1.5 µl. La evaluación comportamental se realizó inmediatamente antes de la inyección en NSL, y posteriormente se repitió a los 5 minutos de la administración del agonista

GABAérgico (grupos pareados, ver Figura 1). El agonista GABAérgico muscimol fue administrado en las siguientes dosis: 2.5 y 0.25 μM . Al terminar el experimento todos los animales se sacrificaron por decapitación. Comprobamos el sitio de la inyección a través de la aplicación de tinta, empleando sólo los datos de aquellos animales que efectivamente fueron microinyectados en NSL.



Figura 1: secuencia de procedimientos experimentales. En el panel A se muestra un corte coronal de cerebro con la cánula implantada sobre el núcleo septal lateral (NSL) derecho (prácticamente en contacto con el cuerpo calloso). En el panel B se muestra la inyección de reactivos en forma directa en el NSL.

Evaluación comportamental:

Ajustamos la evaluación comportamental, en todos los casos, a la siguiente secuencia: los sujetos permanecían en la sala de observación sin ser sometidos a ninguna manipulación por al menos 1 hora previa a la evaluación comportamental. Antes de la evaluación inyectamos un volumen de 1.5 μl de solución salina (grupo control, ver más abajo) o solución salina del agonista GABAérgico muscimol. Los controles sufrieron una única evaluación, en tanto los experimentales se evaluaron antes y después de la inyección de muscimol. En todos los casos la evaluación se realizó a los 15 minutos de la inyección en NSL. Evaluamos, como indicativo de agresividad, la respuesta del animal frente a la exposición de un objeto neutro

(cilindro de madera de 0.5 cm de diámetro y 15 cm de longitud), en términos de: 1) existencia o no de respuesta agresiva frente objeto en cuestión (morder el objeto o no). Realizamos 10 ensayos en un lapso de 3 minutos; y 2) latencia de respuesta: de existir respuesta, se medimos el tiempo transcurrido desde la exposición del objeto hasta la producción de la misma. Adicionalmente, registramos sistemáticamente el comportamiento general del sujeto, en términos de motivación aparente y comportamiento motriz.

Análisis estadístico:

Los datos están expresados como medias (+/- SEM) o como porcentajes de 5-7 ratas por grupo. Los analizamos mediante el test de análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por el test de Newmann-Keuls para comparaciones entre grupos. En el caso de comparaciones pareadas empleamos el correspondiente test de t para dicho propósito. Consideramos una $P < 0.05$ entre grupos como estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Como observamos en la Figura 2, detectamos un aumento significativo en el porcentaje de respuestas agresivas ("mordidas") al objeto neutro al que eran expuestos los animales. El control y los animales experimentales, previo al tratamiento con muscimol, no mostraron interés alguno por el objeto (no obtuvimos respuesta en ningún sujeto, en ninguno de los 10 ensayos que realizamos con cada sujeto). Por el contrario, el grupo experimental tratado con el agonista GABAérgico muscimol presentó una marcada tendencia a responder al objeto neutro mordiéndolo sin latencia alguna en el 75% de los sujetos ensayados, y entre estos el 80% de los mismos presentaron la respuesta agresiva en todos los ensayos que realizamos. No detectamos diferencias en las latencias para responder agresivamente entre los animales experimentales, aunque sí una marcada diferencia entre estos y los

controles (en general inmediatas, con una media de 6 segundos, $P < 0.01$ respecto a control y experimental no tratado). Por último, y a medida que pasaba el tiempo, y como cabe esperar de un agonista GABAérgico, los sujetos tratados mostraron menor movilidad y, aparentemente, motivación que los no tratados, fuesen estos controles o experimentales previos al tratamiento.

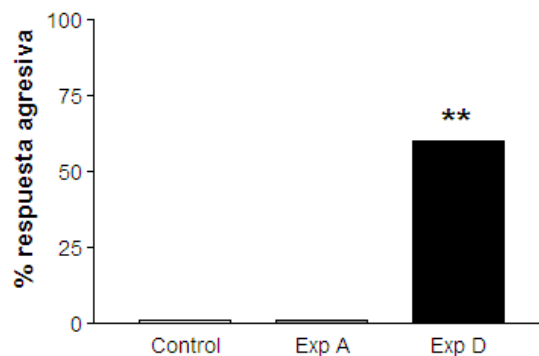


Figura 2: porcentaje de individuos que responde con una respuesta agresiva desproporcionada al estímulo aplicado (A = antes del tratamiento; D = después del tratamiento) (el asterisco indica $p < 0.01$)

Debe destacarse que obtuvimos los resultado de la figura 2 con muscimol 2.5 μM , al contrario de lo que ocurrió con dosis 0.25 μM .

DISCUSIÓN

Diferentes evidencias señalan la participación del NSL en la regulación de procesos que afectan la motivación y el humor (11). También, se ha reportado la posible participación de dicho núcleo tanto en patologías que involucran la alteración de los niveles de dopamina, como es el caso de la esquizofrenia (10), como también en cuadros depresivos mayores (11). Buena parte de estos cuadros –en alguno de ellos

resulta el trastorno primario – comprometen aspectos afectivos en su origen y/o evolución. Entre estos cabe destacar la regulación del humor en tanto disposición agresiva. Se sabe que la lesión del NSL, como hemos señalado anteriormente, genera en el sujeto de experimentación un cuadro cuya característica sobresaliente es la extrema agitación y agresividad –eventualmente asimilable a cuadros de excitación psicomotriz en seres humanos – caracterizado como síndrome de furia septal (10, 12). El síndrome septal en su variante más común se describe como sujetos en un estado de extrema alerta, siguiendo con atención los movimientos del experimentador, temblando frente al menor estímulo auditivo o visual, y con intentos de agredir estímulos normalmente inocuos (10).

En nuestro trabajo ponemos en evidencia que la administración unilateral en el NSL del agonista directo GABAérgico muscimol (que se une al sitio de reconocimiento del neurotransmisor GABA como opuesto a los agonistas indirectos, que poseen su propio sitio de reconocimiento, tales como las benzodiazepinas), a una concentración 2.5 μ M produce un efecto comportamental marcado –presentaron un aumento significativo de comportamiento agresivo– aun cuando no se puede considerar el típico síndrome de furia septal. Dosis menores no disminuyeron la actividad exploratoria de los sujetos experimentales (particularmente actividad locomotora) como tampoco aumenta la agresividad.

Frente a estos datos, y no existiendo un síndrome de furia septal completamente desarrollado (2), podría aceptarse que dicho síndrome resulta al menos en parte altamente dependiente de la destrucción de estructuras septales. En el caso de la administración de agonistas de un sistema de neurotransmisión puede hacerse la disección del síndrome, putativamente, aceptando a priori que el mismo resulta

dependiente de la integridad de más de un sistema de neurotransmisión. En particular, y dada su rico contenido en neuronas GABAérgicas, el uso no excluyente de reactivos que estimulen o inhiban dicho sistema parece particularmente pertinente. El NSL parece efectivamente participar en la regulación de comportamientos que tienen que ver con el miedo, y las respuestas eventualmente adaptativas al mismo. Sheeham et al. (2004) (10) propusieron que la excitación de neuronas septales sería responsable de la inhibición del miedo, en tanto dicha inhibición liberaría respuestas apropiadas frente a situaciones amenazantes. Creemos que en nuestro trabajo los resultados son coherentes con lo propuesto, dado que el agonismo GABAérgico conduce a la puesta en marcha de un sistema inhibitorio de amplia proyección a diversas estructuras cerebrales, algunas de ellas relacionadas con la ansiedad y el miedo, como son el núcleo del rafe dorsal y la sustancia gris periacueductal (13). La intensidad de la manifestación no creemos que sea dosis dependiente, pues es probable que dosis mayores conduzcan a una mayor ansiólisis acompañada eventualmente de hipnosis, y consecuentemente incapacidad de presentar respuestas agresivas o de otro tipo. Por ello, y a la dosis utilizada, quizá sea más apropiado hablar de una moderada “deshinibición del miedo” más que de una respuesta de furia como la descrita originalmente por Brady y Nauta en 1953 (14).

Finalmente, cabe destacar que el NSL parece jugar un destacado rol en temas que involucran miedo y agresividad, quizá dos aspectos de un mismo fenómeno. Su participación en el síndrome de furia septal está comprobado más allá de toda duda. Por su parte, el NSL parece jugar un rol decisivo en algunas patologías de la órbita psiquiátrica en seres humanos, como se señaló más arriba. En dicho sentido todo aquello que contribuya a conocer mejor el rol jugado por este núcleo en dichos

fenómenos resultará en una aproximación más adecuada a dichos cuadros, particularmente en términos de su pronóstico y tratamiento.

Agradecimientos

El presente trabajo recibió financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 5942), por la Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado (SECTyP, 06/J288) de la Universidad Nacional de Cuyo, y por el Centro de Investigaciones Superiores de la Universidad de Mendoza (Resolución Consejo Superior 113/07).

Bibliografía

1. Heilman, K. M. y R. L. Gilmore. "Cortical influences in emotion." J.Clin.Neurophysiol. 15.5 (1998): 409-23
Albert, D. J. y G. L. Chew. "The septal forebrain and the inhibitory modulation of attack and defense in the rat. A review." Behav.Neural Biol. 30.4 (1980): 357-88.
2. Gotsick, J. E. y R. C. Marshall. "Time course of the septal rage syndrome." Physiol Behav. 9.4 (1972): 685-87.
3. Maeda, H. "Effects of septal lesions on electrically elicited hypothalamic rage in cats." Physiol Behav. 21.3 (1978): 339-43.
4. Marotta, R. F. Logan, N., Potegal, M., Glusman, N., Gardner, E.. "Dopamine agonists induce recovery from surgically-induced septal rage." Nature 269.5628 (1977): 513-15.
5. Zalcman, S. S. y A. Siegel. "The neurobiology of aggression and rage: role of cytokines." Brain Behav.Immun. 20.6 (2006): 507-14.
6. Bhatt, S. Zalcman, S., Hassanaim, M., Siegel, A. . "Cytokine modulation of defensive rage behavior in the cat: role of GABAA and interleukin-2 receptors in the medial hypothalamus." Neuroscience 133.1 (2005): 17-28.
7. Potegal M, Yoburn B, Glusman M. "Disinhibition of muricide and irritability by intraseptal muscimol." Pharmacol Biochem Behav. 1983 ;19(4)

8. Miczek K, Fish E, De Bold J. " Neurosteroids, GABA_A receptors, and escalated aggressive behavior." *Hormones and Behavior* 44 (2003) 242–257
9. Risold P, Swanson L. "Chemoarchitecture of the rat lateral nucleus." *Brain Res Brain Res Rev.* 1997, 24:91-113
10. Sheehan, T. P., Chambers, R. A., Russell, D. S. "Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry." *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46.1 (2004): 71-117.
11. Sheehan, T. P. Neve, R., Duman, R., Russell, D. "Antidepressant effect of the calcium-activated tyrosine kinase Pyk2 in the lateral septum." *Biol. Psychiatry* 54.5 (2003): 540-51.
12. Albert D, Chew G. "The septal forebrain and the inhibitory modulation of attack and defense in the rat." *Behav. Neural Biol.* 1980, 30 (4).
13. Siegel A, Bhatt S, Bhatt R, Zalzman S. "The Neurobiological Bases for Development of Pharmacological Treatments of Aggressive Disorders". *Current Neuropharmacology*, 5 (2007): 135-147.
14. Brady J, Nauta W. " Subcortical mechanisms in emotional behavior: affective changes following septal forebrain lesions in the albino rat". 46:5 (1953):339-46.