

Catalepsia fármaco-inducida en el ratón

Drug-induced catalepsy in mice

Dr. Roberto L. Rojas Martínez, Dra. Concepción L. Martínez Marrero

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Universidad de Ciencias Médicas "Dr. Carlos J. Finlay". La Habana, Cuba.

RESUMEN

La catalepsia fármaco-inducida en roedores es un modelo experimental muy utilizado para evaluar extrapiramidismo. No existe una estandarización de la técnica, y en ocasiones las metodologías utilizadas son complicadas en su ejecución y en la evaluación de los resultados. También se han señalado diversos factores que pudieran llevar a una pseudocatalepsia o respuesta falsa positiva. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una técnica sencilla y fiable donde no se observara pseudocatalepsia y verificar la viabilidad de su aplicación. Se describe un procedimiento utilizando ratones en un dispositivo artesanal y se muestran los resultados obtenidos luego de modificar las variables posición del animal, tiempo para realizar la observación y número de observaciones en un mismo animal. Se empleó haloperidol como droga de referencia. Se concluyó que la técnica propuesta es de fácil aplicación y consistente en sus resultados, sin que se observara pseudocatalepsia en la muestra utilizada.

Palabras clave: catalepsia, modelo experimental, ratones, haloperidol.

ABSTRACT

Drug-induced catalepsy in rodents is an experimental model commonly used to study extrapyramidalism. The technique has not been standardized, and the methodologies used are difficult to conduct and do not always facilitate the evaluation of results. Reference has also been made to various factors which might lead to pseudocatalepsy or to a false positive response. The objective of this study was to develop a simple, reliable technique in which pseudocatalepsy would not be observed, and verify the viability of its application. A description is presented of a

procedure using mice in a handmade device and the results obtained after modifying the variables posture of the animal, time to make the observation, and number of observations for a given animal. Haloperidol was used as reference drug. It was concluded that the technique proposed is of easy application and yields consistent results, without any evidence of pseudocatalepsy in the sample used.

Key words: catalepsy, experimental model, mice, haloperidol.

INTRODUCCIÓN

La catalepsia inducida en roedores mediante la administración de fármacos es un modelo experimental muy utilizado para evaluar extrapiramidalismo.¹ Este efecto se interpreta como expresión del bloqueo de los receptores dopaminérgicos D2 postsinápticos en las neuronas nigroestriatales del sistema nervioso central,^{2,3} y constituye un indicador útil en la búsqueda de sustancias potencialmente activas en estas estructuras,⁴ así como en investigaciones encaminadas a caracterizar procesos funcionales del sistema nervioso central.⁵

Se han señalado múltiples factores que influyen sobre los resultados que se obtienen con este modelo, que pueden conllevar a la aparición de pseudocatalepsia, definida como una respuesta viciada del animal que no expresa un verdadero bloqueo dopaminérgico y conduce a un resultado falso positivo.¹ Sin embargo, la técnica no se ha estandarizado a pesar de ser un problema largamente reconocido.⁶

De esta forma, existen múltiples variantes del procedimiento, en las cuales se han utilizado diferentes dispositivos, posiciones del animal, criterios de inmovilidad, tiempos para la observación después de la administración de fármacos, repeticiones de las observaciones, intervalos entre ellas, duración del experimento, por mencionar algunas. Los diversos métodos utilizados han sido descritos como: técnica "de la barra",¹ del "taco de madera",³ de la "espiga horizontal",⁷ de la "plataforma de cristal",⁸ de los "4 corchos",⁹ de la "varilla rotatoria",¹⁰ de la "malla inclinada",¹¹ entre otros.

En ocasiones las metodologías propuestas son complicadas, tanto en la ejecución como en la evaluación de los resultados,¹⁰⁻¹² todo lo cual dificulta su interpretación y comparación entre los diferentes grupos de trabajo, e incluso entorpece la consistencia de dichos resultados dentro de un mismo laboratorio.

Los objetivos del presente informe fueron desarrollar un procedimiento sencillo y fiable donde no se observara pseudocatalepsia, así como verificar la viabilidad de su aplicación.

MÉTODOS

Se utilizaron ratones BALB-C, machos, entre 20 y 24 g de peso corporal mantenidos en condiciones estándares de bioterio, los cuales se pusieron en ayuno 4 horas antes de la ejecución de los experimentos. En el tiempo "cero minutos" (comienzo del experimento) solo se les administraron 10 mL/kg de agua destilada, excepto en la etapa de determinación de las dosis efectivas del haloperidol (ampolletas de 5

mg/mL suministradas por ENSUFARMA). Las diluciones del medicamento se realizaron en agua destilada de modo que el volumen a inyectar fuera igual que el correspondiente volumen de agua inyectado en los experimentos en los cuales no se administraba el medicamento. Siempre se utilizó la vía intraperitoneal. N= 10 para todos los grupos. Una vez sometido el animal a un experimento, era desechado.

Se confeccionó artesanalmente un dispositivo para colocar el ratón, consistente en una varilla de vidrio de 0,8 mm de diámetro sostenida en 2 soportes de madera a una altura de 4 cm y separada de un soporte horizontal de 2,5 cm de altura situado a 2 cm de la porción media de la varilla de vidrio (Fig. A).

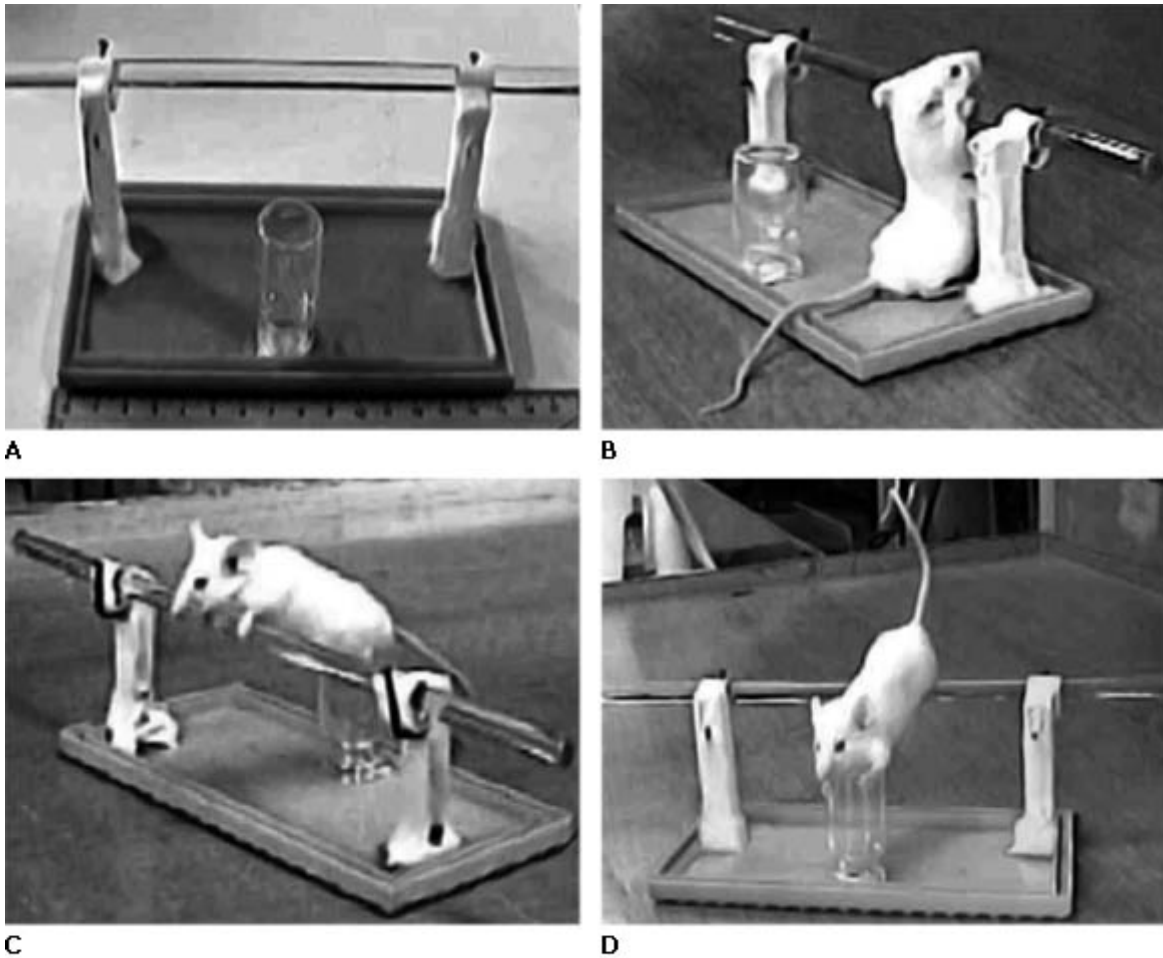


Fig. A: dispositivo para colocar el ratón y observar sus movimientos; **B:** posición de "barra"; **C:** posición de "rezo"; **D:** posición de "sumisión".

Inicialmente se usó la técnica descrita por *Princep*.³ Posteriormente se fueron modificando las siguientes variables:

- Tiempo para realizar la observación después de la inyección.
- Posición en la que se colocaba el animal: "barra", "rezo" y "sumisión" (Figs. B, C y D).
- Número de observaciones en un mismo animal.

Se tomó como criterio de respuesta positiva de catalepsia la inmovilidad total del animal durante 1 min después de ser colocado en la posición correspondiente. Los resultados se expresaron en porcentaje de aparición de la catalepsia (respuesta positiva) dentro de cada grupo.

Se empleó el método de Litchfield y Wilcoxon¹³ para calcular las dosis efectivas media, 16 y 84 del haloperidol (respectivamente DE50, DE16 y DE84).

RESULTADOS

La tabla 1 muestra la frecuencia de aparición de la catalepsia con cada posición utilizada en los tiempos de observación señalados.

Tabla 1. Frecuencia de aparición de catalepsia en las diferentes posiciones y tiempos de observación

Grupo	Tiempo de observación después de la inyección			
	30 min	60 min	180 min	300 min
Barra	10 %	30 %	90 %	90 %
Rezo	10 %	20 %	40 %	50 %
Sumisión	0 %	10 %	30 %	40 %

En la tabla 2 puede observarse la frecuencia de aparición de la catalepsia al eliminar la observación de los 30 min y variar la posición en las sucesivas observaciones con un intervalo de 2 h entre las mismas.

Tabla 2. Frecuencia de aparición de catalepsia al alternar las posiciones en los tiempos señalados

Tiempo de observación después de la inyección y posición impuesta		
60 min	180 min	300 min
Sumisión	Rezo	Barra
0 %	0 %	10 %

Con el objetivo de explorar la posibilidad de alargar la duración del experimento se realizaron observaciones repitiendo la posición de "sumisión" y de "rezo" en un intervalo de tiempo más largo (3 h). Los resultados se presentan en la tabla 3.

Se aplicó el procedimiento descrito en el presente informe sobre el cálculo de las dosis efectivas catalépticas del haloperidol. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 3. Frecuencia de aparición de la catalepsia utilizando, en 2 grupos diferentes de animales, la misma posición a los 60 y los 240 min, y a los 120 y los 300 min después de la inyección

Grupo	Tiempo de observación			
	Experimento 1		Experimento 2	
	60 min	240 min	120 min	300 min
Sumisión	0 %	0 %	0 %	0 %
Rezo	0 %	0 %	0 %	0 %

Tabla 4. Valores calculados de dosis efectivas del haloperidol

Dosis efectiva en mg/kg (intervalo de confianza del 95 %)		
De 50	0,539	0,783 - 0,371
De 84	1,29	2,15 - 0,777
De 16	0,225	0,374 - 0,136

N total de 60 ratones, dosis de 0,1 a 2 mg/kg, vía intraperitoneal.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en la tabla 1 muestran que se observaron respuestas "positivas" con el agua destilada en todos los grupos, las cuales se incrementaron al repetirse las observaciones a los diferentes tiempos. Por esta razón se decidió eliminar la primera observación a los 30 min, con el objetivo de disminuir la manipulación del animal, ya que se ha señalado que este factor puede influir en los resultados.¹ Asimismo, se decidió alternar la secuencia de la posición en un mismo animal para minimizar la posibilidad de una catalepsia "aprendida" o condicionada (pseudocatalepsia). Arbitrariamente se seleccionó el orden "sumisión", "rezo", "barra".

A pesar de haber suprimido la observación de los 30 min y de alternar la secuencia de la posición, se observó una respuesta falso positiva en la tercera posición (tabla 2). En este caso concurren 3 hechos: se trataba de una tercera observación en un

mismo animal, el intervalo entre las observaciones fue de 2 h y la posición parece ser más fácil de sostener que las otras 2. Aunque la incidencia de aparición fue baja, se decidió entonces desechar la posición de "barra" para reducir las observaciones a solo 2 en un mismo animal, así como prolongar a 3 h el intervalo entre las observaciones.

De esta forma, en ningún caso se observó la aparición de pseudocatalepsia (tabla 3). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la prolongación del intervalo entre las observaciones permite incluso repetir la misma posición sin que aparezcan respuestas falso positivas.

Sobre la base de la revisión de la literatura científica y de las observaciones experimentales aquí informadas, a pesar de que la muestra utilizada fue pequeña, se elaboró un procedimiento estandarizado de la técnica que permitió establecer fundamentalmente lo siguiente:

1. Reducir a un mínimo la manipulación del animal previa a la colocación en la posición. Este solamente se tomará por la nuca (pinza digital) para ser inyectado. Toda manipulación posterior se hará tomándolo por la cola.
2. Realizar la primera observación una vez transcurrida 1 h de la inyección.
3. Sólo se harán 3 intentos para colocar el animal en la posición si este se resiste a adoptarla. De no lograrse la posición adecuada, se considerará que la respuesta es negativa (no hay catalepsia).
4. Se considera respuesta positiva (hay catalepsia) cuando el animal mantiene la posición impuesta y no hace movimientos exploratorios con la cabeza durante 60 s, al cabo de los cuales es devuelto a la jaula. Si el animal hace cualquier tipo de movimiento en este intervalo, la respuesta es negativa.
5. Preferiblemente se hará una sola determinación en cada animal. Se podrán hacer hasta 2 observaciones en un mismo ratón, distanciadas al menos 3 horas entre sí. El momento de ejecutarla se ajustará según el tiempo estimado (o explorado) de aparición y duración del efecto en estudio.
6. Se desecha la posición definida como "barra". Se podrá utilizar la posición de "rezo" o de "sumisión", alternada o repetida, siempre que transcurra un mínimo de 3 h entre las observaciones.

El procedimiento propuesto permitió calcular las dosis efectivas del haloperidol. El valor encontrado de DE50 fue similar al informado por otros autores^{9,14} y su ejecución fue de sencilla aplicación, por lo cual se considera totalmente viable.

Se concluyó que el procedimiento expuesto fue de fácil aplicación, y cumpliendo el procedimiento descrito, se pudieron obtener respuestas consistentes en la aparición de catalepsia inducida por el fármaco utilizado, sin que se observaran respuestas falso positivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vera F, Navarro JF, Manzaneque JM. El modelo animal de catalepsia en psicofarmacología. *Iberpsicología*. 1997;2(2).

2. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, editors. Basic and Clinical Pharmacology. Cap. 29. Antipsychotic agents and lithium. 11^a ed. New York: Access Medicine from McGraw-Hill; 2009.
3. Princep M. Investigación y desarrollo de abaperidona, un nuevo antipsicótico 5-HT_{2a} / D₂ y alfa 1 adrenérgico. Modelos *in vitro* e *in vivo* predictivos de eficacia y efectos adversos. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, 2004;28,58. [citado 8 de junio 2011]. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=3380&info=resumen&modo=popup>
4. Trevizol F, Benvegna DM, Barcelos RC, Pase CS, Segat HJ, Dias VT, et al. Comparative study between two animal models of extrapyramidal movement disorders: Prevention and reversion by pecan nut shell aqueous extract. Behav Brain Res. 2011;221: 13-8.
5. Fink-Jensen A, Schmidt LS, Dencker D, Schulein C, Wess J, Wortwein G, et al. Antipsychotic-induced catalepsy is attenuated in mice lacking the M4 muscarinic acetylcholine receptor. Eur J Pharmacol. 2011;656: 39-44.
6. Sanberg PR, Bunsey MD, Giordano M, Norman AB. The catalepsy test: its ups and downs. Behav Neurosci. 1988;102: 748-59.
7. Vogel HG, Vogel WH, editors. Drug Discovery and Evaluation. Pharmacological Assays. Berlin: Springer, 1996. p. E:5.2.4.
8. Antelman SM, Caggiula AR, Kocan D, Knopf S, Meyer D, Edwards DJ, et al. One experience with 'lower' or 'higher' intensity stressors, respectively enhances or diminishes responsiveness to haloperidol weeks later: implications for understanding drug variability. Brain Res. 1991;566: 276-83.
9. Perrault GH, Depoortere R, Morel E, Sanger DJ, Scatton B. Psychopharmacological profile of amisulpride: An antipsychotic drug with presynaptic D₂/D₃ dopamine receptor antagonist activity and limbic selectivity. J Pharmacol Exp Ther. 1997;280: 73-82.
10. Kirschbaum KM, Hiemke C, Schmitt U. Rotarod impairment: catalepsy-like screening test for antipsychotic side effects. Int J Neurosci. 2009;119: 1509-22.
11. Natesan S, Reckless GE, Barlow KBL, Nobrega JN, Kapur S. Partial agonists in schizophrenia - why some work and other do not; insights from preclinical animal models. Int J Neuropsychopharmacol. 2011;14(9): 1165-78.
12. Wadenberg MLG, Fjällström AK, Federley M, Persson P, Stenqvist P. Effect of adjunct galantamine to risperidone, or haloperidol, in animal models of antipsychotic activity and extrapyramidal side-effects liability: involvement of the cholinergic muscarinic receptor. Int J Neuropsychopharmacol. 2011;14: 644-54.
13. Rojas R, Pérez A, del Calvo O. Cálculo del índice terapéutico de una droga. Rev Cub Invest Bioméd. 1993;12: 125-29.

14. Navarro JF, Muñoz AL, Rivas T, Miñarro J, Simon VM. Efectos del haloperidol sobre la catalepsia en ratones machos. *Psicothema*. 1992;4:369-377.

Recibido: 24 de febrero de 2012.

Aprobado: 26 de abril de 2012.

Dr. *Roberto L. Rojas Martínez*. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Calle 146 y Ave. 31, Playa. La Habana, Cuba. Tel. 208-4877 ext. 246.
Correo electrónico: rluis.rojas@infomed.sld.cu