

La infusión de yohimbina induce cambios noradrenérgicos en ratas con daño cerebral motor y facilita la recuperación funcional motora

Rigoberto González-Peña,* Alfonso Alfaro-Rodríguez,** Antonio Bueno-Nava,*** Alberto Ávila-Luna,**

Resumen

Introducción: se ha propuesto que la noradrenalina es uno de los neurotransmisores que dirige la recuperación funcional después del daño cerebral. Se considera que son los receptores noradrenérgicos alfa-2 quienes juegan un papel importante para el restablecimiento de las funciones al modular el contenido de noradrenalina. **Objetivo:** estudiar el papel de los receptores alfa-2 sobre los contenidos totales de noradrenalina en el cerebelo y el puente de ratas con daño cortical motor inducido con hierro dextrano.

Material y métodos: se utilizaron 15 ratas Wistar asignadas a tres grupos: control ($n = 5$) con infusión intracortical de solución salina; lesionado ($n = 5$) con infusión intracortical de hierro dextrano e infusión intraventricular de solución salina, y lesionado + yohimbina (antagonista de receptores alfa-2) ($n = 5$) que recibieron hierro dextrano y una infusión intraventricular de yohimbina. La evaluación conductual motora se realizó mediante el paradigma de la barra de equilibrio. Tres días después de la cirugía, se extrajeron tanto los lados derecho e izquierdo del puente, y hemisferios cerebelares. Los tejidos se procesaron para el análisis de noradrenalina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

Resultados: los animales administrados con yohimbina presentaron incremento de noradrenalina en el lado derecho del puente y disminución de ésta en el hemisferio derecho cerebelar, mientras que el déficit motor es menor que en los animales lesionados.

Conclusión: el bloqueo de los receptores presinápticos alfa-2 dirige a un incremento de noradrenalina en el locus coeruleus que protege parcialmente de los efectos de la lesión cerebral.

Palabras clave: noradrenalina, lesión cortical, recuperación funcional.

Abstract

Introduction: It has been proposed that noradrenaline is one of the neurotransmitters involved in the functional recovery. In this sense, it has been proposed that the alpha-2 noradrenergic receptors play an important role in the functional reinstatement. **Objective:** the aim of this work was to study the role of the alpha-2 noradrenergic receptors on the noradrenaline contents in cerebellum and pons of rats iron-injured in the motor cortex.

Methods: Fifteen male Wistar rats were allocated in three groups: control ($n = 5$) with intracortical infusion of saline (0.9%), injured ($n = 5$) with intracortical infusion of dextran iron and intraventricular infusion of saline, and injured + yohimbine (alpha-2 receptor's antagonist; $n = 5$) that received an intracortical infusion of dextran iron and also an intraventricular infusion of yohimbine. Motor behavior was assessed by means of the beam-walking paradigm. Three days after surgeries, the animals were sacrificed and the left and right sides of the pons and the cerebellar hemispheres were extracted. Tissues were prepared for noradrenaline analysis by means of high performance liquid chromatography.

Results: We observed that the yohimbine-treated animals had a noradrenaline increase in the right side of the pons and a decrease in the right cerebellar hemisphere.

Conclusion: It is concluded that the blockage of the alpha-2 receptors leads to an increase of noradrenaline in the locus coeruleus, which retards the effects of the cerebral injury.

Key words: Noradrenaline, cortical injury, functional recovery.

* Laboratorio de Neuroplasticidad

** Laboratorio de Neuroquímica

*** Laboratorio de Cromatografía y Microdialisis
Instituto Nacional de Rehabilitación

Correspondencia:

Dr. Rigoberto González Piña,
Torre de Investigación, Instituto Nacional de Rehabilitación.
Calz. México-Xochimilco 289 Col.: Arenal de Guadalupe
Tlalpan. C.P. 14389. D.F. México.
Tel.: (55) 59991000 ext. 19201, 19214
Correo electrónico: higo@prodigy.net.mx

Recibido para publicación: 30-09-2011

Aceptado para publicación: 09-08-2012

Introducción

El daño cerebral significa un problema importante para la salud, pues quien lo padece sufre de graves consecuencias. De acuerdo a Goldstein,¹ el déficit motor es una de las principales secuelas, que produce limitaciones importantes para el funcionamiento de la persona en su cotidianidad. El daño cortical por ablación produce restricciones motoras similares a la hemiplejia.^{2,3} Según la definición de Farreras-Valenti y Rozman,⁴ ésta es la pérdida de la facultad para realizar movimientos dominados por la acción voluntaria, circunscrita en la mitad derecha o izquierda a partir

del plano corporal medio. Esta afectación también provoca secuelas en el área motora fina con la que se involucra el habla, y además se ven comprometidas las habilidades de comunicación.³

La lesión cortical motora ha sido replicada en el laboratorio con animales experimentales, en los que se ha observado una recuperación espontánea. En consecuencia, el modelo es útil para estudiar los mecanismos que conllevan al proceso de recuperación funcional.⁵

Las investigaciones realizadas en animales sugieren que la recuperación después de una lesión focal puede ser modulada por la administración de medicamentos de forma sistémica, éstos impactan sobre los neurotransmisores de forma específica y originan una nueva alternativa para mejorar las consecuencias originadas por un daño en humanos.¹ Además, según Feeney et al.,⁶ la maduración de la lesión puede ser una oportunidad para intervenir y revertir la progresión de los procesos patológicos que dan lugar a la muerte neuronal.

En este sentido, se ha reportado que la noradrenalina es un neurotransmisor importante en la recuperación después del daño cerebral⁷ y que incluso está circunscrito a regiones específicas del cerebro, tales como el cerebelo y el puente.⁸ Ésta es una sustancia estimuladora de la función motora, en consecuencia, su déficit se relaciona con la reducción de la misma.^{8,9}

El principal objetivo de cualquier tratamiento terapéutico es la promoción de la recuperación funcional, es por eso que la administración de noradrenalina, anfetaminas y precursores exógenos se pueden considerar opciones para lograr dicho objetivo en pacientes con daño cerebral motor.¹⁰ Existe sólo un estudio donde la yohimbina fue utilizada en pacientes con daño cerebral, se encontró que ésta facilita la recuperación motora cuando se administra en dosis única después de un daño cortical unilateral.¹¹ La yohimbina es un alcaloide abundante en la corteza del árbol *Pausinystalia yohimbe* y ha sido ampliamente utilizada como antihipertensivo, aunque también tiende a elevar la presión sanguínea durante el reposo, se ha identificado como antagonista de los receptores noradrenérgicos alfa-2;¹² estos receptores regulan la liberación de noradrenalina en las terminales noradrenérgicas del sistema nervioso¹³ y su activación disminuye la liberación de noradrenalina en la terminal sináptica.¹⁴

El uso de otras substancias que aumentan la actividad del sistema noradrenérgico reduce en poco tiempo las limitaciones motoras originadas por el daño en animales experimentales.⁶ Adicionalmente, cuando estos fármacos se administran en humanos, los movimientos voluntarios se restablecen en pacientes hemipléjicos.^{1,15} Todo esto sugiere la posibilidad de que los mecanismos básicos que dirigen la recuperación funcional sean similares tanto en la rata como en el humano.¹⁶

El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos noradrenérgicos y su sustrato anatómico, mediante la administración de un antagonista noradrenérgico presináptico, en la recuperación funcional motora después del daño cerebral inducido por hierro dextrano en ratas.

Como hipótesis, se esperaría entonces que la yohimbina bloquee a los receptores noradrenérgicos alfa-2, estimulando la liberación de noradrenalina y de esta manera, prevenirá de las secuelas del daño.

Material y métodos

Se utilizaron 15 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 350-400 g. Los animales se mantuvieron durante el experimento en cajas de acrílico, con una dieta comercial con pellets para roedores (Purina®) y agua purificada. Adicionalmente, tuvieron ciclos de luz / oscuridad de 12 horas respectivamente y una temperatura ambiente entre los 18 y 22°C. El manejo de las ratas se realizó de acuerdo a las especificaciones para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.¹⁷ El trato prodigado se ajustó a los principios éticos de la investigación con animales, contenidos en el Anexo XV-A del mismo manual y que se han adoptado como normas internacionales.

Previo a la cirugía, los grupos fueron divididos de forma aleatoria para formar tres grupos de cinco animales cada uno. El primer grupo (control) recibió una infusión a nivel cortical de solución salina (con un flujo de 2 µl por minuto). El segundo, recibió una infusión a nivel cortical de hierro dextrano (Hydex® 60 µl / 1 ml de solución salina con un flujo de 2 µl por minuto) y a nivel ventricular sólo se le administró solución salina (con un flujo de 5 µl por minuto). El tercer grupo recibió una infusión cortical de hierro dextrano (Hydex® 60 µl / 1 ml de solución salina con un flujo de 2 µl por minuto) y una infusión intraventricular de yohimbina (0.4 mg / ml de solución salina con un flujo de 5 µl por minuto). Antes de someter a las ratas a cirugía estereotáctica, se entrenaron para pasar caminando sobre una barra de equilibrio de madera con el fin de evaluar la coordinación motora global, según el método descrito por Bueno Nava et al.,⁸ y se tomaron 4 registros basales. Al cuarto día de registro, se practicaron las cirugías correspondientes y se continuó con la evaluación motora por tres días, obteniendo siete sesiones conductuales en total.

Los procedimientos para la administración de sustancias se realizaron mediante cirugía estereotáctica para la cual se pesó a cada rata de investigación para determinar la dosis exacta de anestesia a utilizar (ketamina- xilacina 100 mg / kg – 5 mg/kg) ésta se colocó por la vía intraperitoneal y una vez anestesiadas se montaron en un aparato estereotáxico (Stoeling) colocando los lápices del equipo

en los orificios auriculares y los incisivos sobre el soporte diseñado para ello. El cráneo fue expuesto por medio de una incisión con bisturí sobre el cuero cabelludo. Se realizó una trepanación (diámetro de 1 mm, aproximadamente) usando un taladro quirúrgico (XL-30W Osada Electric) sobre la corteza motora representativa del miembro posterior izquierdo, localizada en las siguientes coordenadas: anteroposterior 2 mm, lateral 2 mm y profundidad 1 mm con respecto a bregma según Hall y Lindholm.¹⁸ Para la administración de salina o yohimbina intraventricular se utilizaron las coordenadas: anteroposterior 0.8 mm, lateral 1.5 mm y profundidad 3.5 mm con respecto a bregma, según el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson.¹⁹ Posteriormente, para la administración de las sustancias se insertaron por separado, tres agujas de calibre 28 acopladas a micromangueras (CMA, FEP TUBING, 10 µl / 10 cm). A su vez, estas mangueras se encontraban conectadas a jeringas Hamilton (1 ml) las cuales fueron colocadas en una bomba de microinfusión (CMA 400 Syringe Pump) calibrada a distintos flujos según la sustancia a administrar. Al terminar, se suturó el cuero cabelludo con catgut 00 y se proporcionaron los cuidados postoperatorios necesarios. La figura 1 muestra una imagen de la preparación quirúrgica para el acceso al cerebro, con los lápices de acero colocados en los orificios auriculares y los incisivos en la plataforma adecuada para ello. La rata se encuentra con el vientre sobre un colchón térmico que regula la temperatura durante la cirugía. Se observa también una cánula sobre el cráneo, a través de la que se administran las sustancias para causar la lesión, solución salina o la yohimbina.

Después de 72 horas las ratas fueron sacrificadas, procedimiento que se realizó en este punto considerando que se ha descrito que el déficit motor alcanza su máximo en este tiempo después de realizada la lesión.⁸ Los cerebros fue-



Figura 1. Fotografía de una rata Wistar que muestra el montaje adecuado sobre el aparato estereotáxico (ver texto para detalles).

ron extraídos y divididos en hemisferio izquierdo y derecho para después separarlos por estructuras, las cuales correspondieron a los hemisferios cerebelares derecho e izquierdo así como el puente derecho e izquierdo. Todas las muestras fueron colocadas en 1 ml de solución antioxidante compuesta de 500 ml de agua 2.7 ml de ácido perclórico (HClO_4) al 70% y 0.5 g de metabisulfito de sodio que después fueron maceradas en un sonificador ultrasónico (Ovni-Ruptor 250), centrifugadas a 15,000 rpm en una ultracentrifuga a 4°C durante 20 minutos y mantenidas en un ultracongelador a -70°C (REVCO, UltimaII) hasta el momento de su análisis por cromatografía.

El contenido de noradrenalina de cada muestra, se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ED) de acuerdo al método descrito por González Piña et al.⁷

El análisis estadístico consistió en ANOVA simple para comparar las medias de los contenidos totales de noradrenalina obtenidos de ambos hemisferios del cerebelo y de ambos lados del puente y una prueba pos Hoc de Tukey, ya que estos datos fueron obtenidos a partir de la interpolación de una curva de concentraciones conocidas en el HPLC-ED. Por otro lado, los resultados del análisis conductual se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y un análisis *pos hoc* de U de Mann Whitney debido a la naturaleza ordinal de los datos. El nivel de probabilidad empleado fue de 0.05 para todos los casos.

Resultados

Los niveles de noradrenalina hallados en los animales que recibieron el hierro dextrano se encontraron significativamente disminuidos en el lado izquierdo del puente, en comparación con los hallados en el grupo control ($p < 0.01$). En el caso de las ratas tratadas con yohimbina, se descubrió incremento significativo de los niveles de noradrenalina en el lado derecho del puente ($p < 0.01$) y disminución en el lado izquierdo tanto en el puente como en el cerebelo ($p < 0.01$). Todos estos cambios fueron con respecto al grupo control, aunque el incremento observado en las ratas lesionadas administradas con yohimbina también fue significativo con respecto al grupo lesionado (Cuadros I y II).

Por otro lado, el estudio conductual mostró que los animales a los que se les administró la yohimbina presentaron un desarrollo lento de las secuelas del daño con respecto a los animales lesionados. Al final del estudio, todos los animales alcanzaron un grado similar de recuperación funcional (Figura 2). Se observó que las calificaciones fueron iguales en todos los animales y que al día 4, en el que se realizaron las cirugías, cada grupo de ratas mostró diferentes tendencias. Se resalta que las ratas tratadas con yohimbina

Cuadro I.

Contenido total de noradrenalina en el puente ($\mu\text{M} / \text{g}$ de tejido fresco)		
	Lado derecho	Lado izquierdo
Control	137.73 \pm 16.36	223.18 \pm 13.64
Hierro	149.09 \pm 14.09	168.18 \pm 20.45 ^a
Yohimbina	198.64 \pm 32.27 ^{a,b}	155.91 \pm 9.55 ^a

Se muestran los contenidos de noradrenalina encontrados en las diferentes porciones del puente estudiadas. Los datos corresponden a la media \pm error estándar de la media. Control, ratas a las que se les administró solución salina en la corteza motora. Hierro, ratas a las que se les administró 10 μl de una solución de hierro dextrano (60 $\mu\text{l}/\text{ml}$) en la corteza motora y solución salina intraventricular. Yohimbina, ratas a las que se les administró hierro dextrano en la corteza motora y yohimbina (0.4 mg) intraventricular. a. significativo con respecto a control, b. significativo con respecto a hierro. ANOVA y pos hoc Tukey ($p < 0.05$)

Cuadro II.

Contenido total de noradrenalina en cerebelo ($\mu\text{M/g}$ de tejido fresco)		
	Hemisferio derecho	Hemisferio Izquierdo
Control	81.82 \pm 11.36	83.64 \pm 10.91
Hierro	66.82 \pm 5.91	74.55 \pm 15.91
Yohimbina	44.09 \pm 3.64 ^{a,b}	64.55 \pm 9.09

Se muestran los contenidos de noradrenalina encontrados en los hemisferios cerebelares. Los datos corresponden a la media \pm error estándar de la media. Control, ratas a las que se les administró solución salina en la corteza motora. Hierro, ratas a las que se les administró 10 μl de una solución de hierro dextrano (60 $\mu\text{l}/\text{ml}$) en la corteza motora y solución salina intraventricular. Yohimbina, ratas a las que se les administró hierro dextrano en la corteza motora y yohimbina (0.4 mg) intraventricular. a. significativo con respecto a control, b. significativo con respecto a hierro. ANOVA y pos Hoc Tukey ($p < 0.05$)

presentan un déficit motor menor que el que se observa en las ratas lesionadas.

Discusión

Los resultados obtenidos muestran un proceso de inhibición funcional noradrenérgica a nivel pontino y a nivel cerebelar, que se encuadra en la teoría de la diasquisis.¹⁵ En esta teoría, se plantea que las secuelas de la lesión son debidas a la inhibición metabólica de sitios alejados del área dañada, pero relacionados anatómicamente con estas. Se sabe que

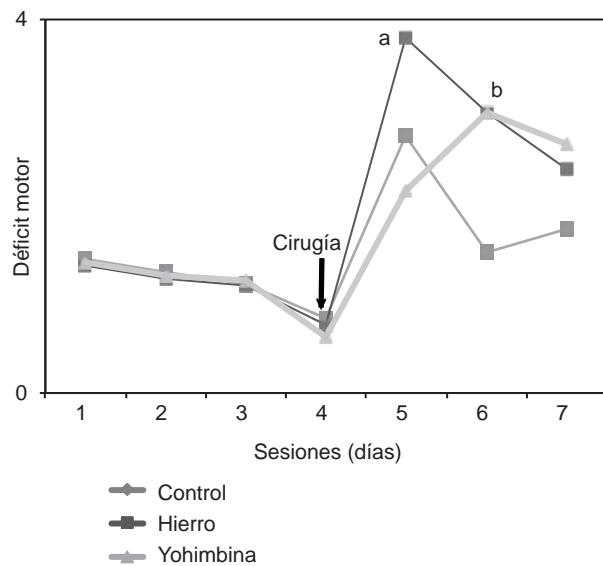


Figura 2. Resultados del análisis motor mediante el paradigma de la barra de equilibrio. No se muestran los errores estándar de la media para evitar la congestión de líneas en la gráfica. a. hierro significativo con respecto a control; b. hierro y yohimbina significativos con respecto a control. Kruskall-Wallis y pos hoc U de Mann Whitney ($p < 0.05$).

las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus, localizado en el puente, proyectan hacia la corteza y que estas mismas neuronas también proyectan hacia el cerebelo.^{17,20} De esta forma, la disminución de noradrenalina en el lado izquierdo del puente observada en los animales lesionados puede ser explicada como una inhibición noradrenérgica producida por la lesión cortical inducida por el hierro dextrano. Considerando que Feeney y Sutton¹¹ describieron que la administración de yohimbina facilita la recuperación funcional después del daño, nuestros resultados muestran que la yohimbina induce incremento de noradrenalina en el lado derecho del puente aunque no del lado izquierdo, mostrando que la reacción pontina ante la lesión cortical es ipsilateral al daño. Sin embargo, hay que considerar que la yohimbina también actúa sobre el sistema dopaminérgico y serotonérgico, por lo que de ser el caso, entonces los receptores presinápticos alfa-2 no son los únicos involucrados en la recuperación funcional. Por otro lado, es posible que al momento en el que los eventos subyacentes a la lesión terminan, los niveles de noradrenalina se restablecen y se presenta la recuperación. Esto ya ha sido documentado por Bueno Nava et al.,⁸ que reportaron que el hierro puede favorecer la formación de radicales libres en el tejido cerebral, lo que causa degeneración de fibras de la corteza con necrosis (y posiblemente apoptosis, muerte celular genéticamente programada) es lo que causaría la disminución de nora-

drenalina, ya que estos autores reportaron incremento de la peroxidación lípidica, indicador de la actividad de radicales libres, en el puente. Cuando estos niveles de peroxidación disminuyeron, los niveles de noradrenalina se restablecieron y esto se relacionó con la recuperación conductual del movimiento. Así, es importante continuar con el estudio de las secuelas del daño desde un punto de vista conductual, en el caso de la inyección de hierro dextrano, pues esta forma férrica es más estable, por lo que se espera que la generación de radicales libres se puede sostener por más tiempo que en el caso de la inyección de hierro ferroso, que fue el utilizado en el trabajo descrito.

Conclusiones

Los mecanismos de recuperación deben estudiarse con profundidad, pues en el caso del hombre, el hierro se puede liberar en el cerebro mediante la hemorragia subaracnoidea, ya que la hemoglobina lo contiene. Si bien entre la rata y el hombre hay millones de años de evolución, los procesos básicos de recuperación parecen ser muy similares, se ha reportado que la administración de anfetamina, un agonista noradrenérgico, es capaz de inducir recuperación motora en la rata y también en el humano, corrigiendo incluso los problemas del habla en pacientes con daño cerebral motor.¹

En este trabajo se demostró que la yohimbina, al ser un bloqueador de los receptores noradrenérgicos alfa-2, induce incremento de noradrenalina que protege a los animales de las secuelas del daño cerebral.

Estos resultados contribuyen en la búsqueda de estrategias farmacológicas para el tratamiento de la discapacidad motora provocada por daño cerebral tales como la hemiplejía y otras discapacidades derivadas.

Referencias

1. Goldstein LB. Neuropharmacology of TBI-induced plasticity. *Brain Injury* 2003;17(8):685-694.
2. González-Piña R, Bueno-Nava A, Ávila-Luna A. Recuperación funcional motora después del daño cerebral. Un enfoque farmacológico. En: Alfaro-Rodríguez A, González-Piña R y Morales-Martínez JJ. Tópicos de Neurociencias en la Comunicación Humana. 1^a ed. México DF, Manuales de Medicina de la Comunicación Humana, 2005 p. 195-214.
3. González-Piña R, Bueno-Nava A, Alfaro-Rodríguez A, Durand-Rivera JA. Caracterización de la conducta motora en ratas con ablación cortical. *Rev Neurol* 2008;47(6):304-309.
4. Farreras-Valenti P, Rozman C. Medicina interna. 1a. ed. México D.F. Marín, 1976 p. 122.
5. Brailowsky S, Knight RT, Blood K, Scabini D. Gamma-aminobutyric acid-induced potentiation of cortical hemiplegia. *Brain Res* 1986;362(2):322-330.
6. Feeney DM, De Smet AM, Rai S. Noradrenergic modulation of hemiplegia: Facilitation and maintenance of recovery. *Rest Neurol Neurosci* 2004;22(3-5):175-190.
7. González-Piña R, Bueno-Nava A, Montes S, Alfaro-Rodríguez A, González-Macié A, Reynoso-Robles R, et al. Pontine Norepinephrine Content after Motor Cortical Ablation in Rats. *Proc West Pharmacol Soc* 2005;48:73-76.
8. Bueno-Nava A, Montes S, De la Garza-Montano P, Alfaro-Rodríguez A, Ortiz A, González-Piña R. Reversal of noradrenergic depletion and lipid peroxidation in the pons after brain injury correlates with motor function recovery in rats. *Neurosci Lett* 2008;443(1):32-36.
9. Boyeson MG, Krobert KA. Cerebellar norepinephrine infusions facilitate recovery after sensorimotor cortex injury. *Brain Res Bull* 1992;29(3-4):435-439.
10. Kikuchi K, Nishino K, Ohya H. Increasing CNS norepinephrine levels by the precursor L-DOPS facilitates beam-walking recovery after sensorimotor cortex ablation in rats. *Brain Res* 2000;860(2):130-135.
11. Feeney D, Sutton RL. Catecholamines and recovery of function after brain damage. En: Fenney D. Pharmacological approaches to the treatment of brain and spinal cord injury. 1a ed. New York, NY: Plenum Publishing Corporation, 1988 p. 121-142.
12. Biaggioni I, Robertson RM, Robertson D. Manipulation of norepinephrine metabolism with yohimbine in the treatment of autonomic failure. *J Clin Pharmacol* 1994;34(5):418-423.
13. Stjarne L. Basic mechanisms and local modulation of nerve impulse-induced secretion of neurotransmitters from individual sympathetic nerve varicosities. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1989;112(1):1-137.
14. Cooper JR, Bloom F.E, Roth R.H. The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press Seventh Edition, 1996 New York, p. 249.
15. Goldstein LB. Effects of amphetamines and small related molecules on recovery after stroke in animals and man. *Neuropharmacology* 2000;39(5):852-859.
16. González-Piña R, Bueno-Nava A, Escalante-Membrillo C, Montes S, González-Macié A, Ayala-Guerrero F. Cerebellar and pontine norepinephrine contents alter motor recovery in rats. *Rest Neurol Neurosci* 2003;21(5-6):219.
17. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide for the care and use of experimental animals. 1a ed. Ottawa, ON: Can. Council Animal Care, 1993 p. 1-211.
18. Hall R, Lindholm EP. Organization of Motor and Somatosensory Neocortex in the albino rat. *Brain Res* 1974;66(1):23-28.
19. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4a ed. Academic Press San Diego, CAL, 1998 p. 128.
20. González-Piña R, Bueno-Nava A, Montes S, Alfaro-Rodríguez A, González-Macié A, Reynoso-Robles R, et al. Pontine and cerebellar norepinephrine content in adult rats recovering from focal cortical injury. *Neurochem Res* 2006;31(12):1443-1449.