

2. Material y Técnicas

2.1 Animal de experimentación. Grupos

Para nuestro estudio hemos utilizado como animal de experimentación la rata albina de la cepa Sprague-Dawley, por su facilidad de reproducción y mantenimiento y porque en el Departamento donde hemos llevado a cabo el trabajo hay una amplia experiencia sobre esta especie. Las hembras han sido excluidas del presente estudio ya que la reactividad de la glia puede modificarse en el curso del ciclo estral en alguno de los territorios a estudiar.

Todos los animales empleados en nuestro trabajo han sido tratados de acuerdo con las directrices de la CE y el Gobierno de España relativas al cuidado de los animales de experimentación (RD 1201/2005) y las recomendaciones de la Unión Europea recogidas en el Diario Oficial de la Unión Europea de 2007/526/CE. Desde el nacimiento todas las ratas han estado sometidas a un ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas y a temperatura ambiental constante (18-20°C), disponiendo libremente de comida y agua hasta el momento del sacrificio.

Hemos utilizado un total de 45 ratas que, al inicio del tratamiento tenían 30 días de edad y un peso aproximado de entre 100 y 110 gramos, los animales se repartieron en los siguientes grupos:

Grupo 1.- Animales tratados con antipsicóticos típicos

Grupo 1a. Animales tratados con Clorpromazina

Grupo constituido por 6 ratas que recibieron durante 40 días dosis progresivas de clorpromazina (Largactil ®). La administración se realizó por vía intramuscular en una dosis diaria siguiendo la siguiente pauta: entre los días 1 y 12 de la administración la dosis ascendió progresivamente de 8 a 13 mg/kg/día (a razón de 1 mg más cada dos días). A partir del día 13 las ratas eran inyectadas con 14 mg/kg/día hasta el día 40 en que finalizó el tratamiento, siendo sacrificados los animales al día siguiente.

Grupo 1b. Animales tratados con Haloperidol

Corresponde a un grupo de 6 ratas que fueron inyectadas con el antipsicótico por vía intramuscular a dosis de 2 mg/kg/día durante 40 días, siendo sacrificadas al día siguiente de finalizado el tratamiento.

Animales controles

El grupo control de los antipsicóticos típicos, está formado por 5 ratas inyectadas por vía intramuscular durante 40 días, al mismo tiempo que las tratadas, con un volumen de agua destilada igual al utilizado en la inyección de los antipsicóticos y sacrificadas inmediatamente después.

Grupo 2.- Animales tratados con antipsicóticos atípicos

Grupo 2a. Animales tratados con Risperidona y sus controles

El grupo que recibió el antipsicótico atípico Risperidona (Risperdal ®) estaba formado por 6 ratas a las que se les administró diariamente durante 40 días, por vía intramuscular, una dosis de 2.5 mg/kg de peso del antipsicótico diluído en etanol. El sacrificio se realizó igualmente al día siguiente de finalizar el tratamiento.

Como controles empleamos 5 animales inyectados con el mismo volumen de etanol al 100%, durante 40 días y que fueron sacrificados a la finalización del tratamiento.

Grupo 2b. Animales tratados con Olanzapina (*Zyprexa, Lilly*)

6 ratas fueron inyectadas diariamente por vía intramuscular, con una dosis de 10 mg/kg de peso durante 40 días. Del mismo modo que en otros tratamientos, los animales se sacrificaron al finalizar el tratamiento.

Grupo 2c. Animales tratados con Ziprasidona

Grupo de 6 ratas a las que se administró diariamente, por vía intramuscular, el antipsicótico atípico Ziprasidona (Zeldox ®) a dosis de 12 mg/kg de peso, durante 40 días, al cabo de los cuales fueron sacrificados.

Como controles de los tratamientos de Olanzapina y Ziprasidona empleamos 5 animales inyectados con un volumen de agua bidestilada igual al utilizado para la inyección de los antipsicóticos, durante 40 días, siendo sacrificados a la finalización del tratamiento.

2.2 Sacrificio de los animales. Inclusión de las muestras

El sacrificio se realizó por decapitación con una guillotina para pequeños animales, lo que permitió la rápida extracción del cerebro. En los segundos siguientes a la decapitación, se procedía a extraer el encéfalo que se sumergía inmediatamente en la mezcla fijadora. A continuación se tallaba el encéfalo realizando cortes frontales, el primero de ellos separa la parte más anterior de los lóbulos frontales del resto del encéfalo, el segundo el tronco del encéfalo y el cerebelo y el último dividía la pieza restante en dos mitades que fueron de nuevo sumergidas en la mezcla fijadora.

Como fijador hemos utilizado la solución de Bouin, que se prepara disolviendo 5 cc de ácido acético glacial y 25 cc de formaldehído comercial (35-40%) en 75 cc de solución saturada de ácido pícrico.

Tras permanecer 72 horas en la solución fijadora, los bloques fueron lavados con varios pases por una solución acuosa saturada de carbonato de litio y a continuación deshidratados mediante alcoholes de gradación creciente. Los pases por los alcoholes de 70° y 96° duraron dos horas cada uno. A continuación los bloques fueron pasados tres veces por alcohol absoluto (sesenta minutos cada uno de los pases). Tras tres pases de treinta minutos cada uno por benceno, las piezas fueron incluidas en parafina según el proceder habitual.

De cada bloque se obtuvieron cortes coronales seriados de 10 micras de grosor que fueron montados sobre portaobjetos (2 cortes por portaobjeto), utilizando una solución de gelatina-alumbre de cromo como adhesivo. Posteriormente se procedió a teñir con hematoxilina de Weigert un porta de cada 10, lo que nos permitió, bajo microscopio óptico, seleccionar los portas que contenían los territorios objeto de estudio para

la realización de las tinciones inmunohistoquímicas. Los territorios elegidos para las tinciones son: la corteza dorsolateral y cingular, el hipocampo, el estriado, el complejo amigdalino, el núcleo Accumbens y el hipotálamo mediobasal.

Previamente a la realización de las tinciones los cortes fueron desparafinados y rehidratados de acuerdo con la siguiente pauta:

- 1º: xilol I, 15 minutos
- 2º: xilol II, 15 minutos
- 3º: xilol III, 15 minutos
- 4º: alcohol absoluto I, 10 minutos
- 5º: alcohol absoluto II, 10 minutos
- 6º: alcohol absoluto III, 10 minutos
- 7º: alcohol 96º, 10 minutos
- 8º: alcohol 70º, 20 minutos
- 9º: alcohol 70º con H₂O₂ para bloqueo de peroxidasa endógena
- 10º: agua bidestilada

Los cortes quedaban de esta forma preparados para la tinción.

2.3 Tinción inmunohistoquímica para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP)

Para proceder a la tinción, después de la desparafinización y rehidratación de los cortes, se siguieron las siguientes pautas:

1º.- Lavado con TPBS (40 mM Tris, 3.5 mM KH₂PO₄, 8.4 mM Na₂HPO₄, 120 mM ClNa, 0.02% NaN₃, ajustado a pH 7.8 con ClH), durante 15 minutos.

2º.- Incubación con el antisuero primario [anti-proteína glial fibrilar ácida (Anti-GFAP de DAKO), a dilución 1:400] diluido en TPBS con 0.7% de lambda carrageenan (Sigma) y 0.5% de Triton X-100 (Merck). La incubación se realizó durante 18 horas, a temperatura ambiente.

3º.- Lavado con TPBS, tres pases de 15 minutos.

4º.- Antisuero secundario [cabra anti-conejo biotinizado (Sigma), a dilución 1:30] diluido en TPBS con 0.7% de lambda carrageenan (Sigma) y 0.5% de Triton X-100 (Merck). Se incubó durante 1 hora, a temperatura ambiente.

5º.- Lavado con TPBS, tres pases de 5 minutos.

6º.- Complejo Avidina-Peroxidasa (Sigma), a dilución 1:30, en TPBS, durante 60 minutos, a temperatura ambiente.

7º.- Lavado con TBS [Tris-ClH 0.05 M, 0.15 M ClNa, pH 7.6], durante 15 minutos, a temperatura ambiente.

8º.- Preincubación en 3,3'-diaminobenzidina [40 mg de DAB (Sigma) y 68 mg de imidazole (Sigma) en 100 ml de TBS] durante 5 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad.

9º.- Incubación en la misma solución del apartado anterior a la que se añaden 50 µl de H₂O₂ al 30%, durante 3 minutos.

2.4 Tinción de contraste

Como tinción de contraste hemos utilizado la hematoxilina de Weigert. Con esta técnica se tiñen de azul los núcleos celulares. Se realiza del siguiente modo:

1º.- Tinción con hematoxilina de Weigert, durante 30 segundos.

La hematoxilina de Weigert se prepara mezclando a partes iguales una solución de hematoxilina al 1% en alcohol de 96° con una solución al 1,16% de percloruro de hierro en CIH concentrado al 1%. La mezcla es estable durante una semana.

2º.- Diferenciación en solución al 1% de CIH concentrado en alcohol de 70°, mediante dos inmersiones.

3º.- Virado al azul en agua corriente, durante un mínimo de 30 minutos.

Tras finalizar la reacción inmunohistoquímica y después de la tinción de contraste, los cortes fueron lavados con agua bidestilada, deshidratados con alcoholes de gradación creciente, aclarados en xilol y montados con DePeX según el procedimiento habitual.

2.5 Estudio y fotografiado de las muestras

El estudio se realizó en un microscopio Nikon microphot-FXA. El fotografiado de las preparaciones se llevó a cabo con una máquina digital Nikon Coolpix modelo 995.

2.6 Cuantificación de los astrocitos

En los territorios del núcleo Accumbens y de la corteza cingular, donde tras el examen de las imágenes se advertía un incremento de las células reactivas, se procedió a efectuar un conteo de los elementos marcados. Para ello tomamos al azar 12 portaobjetos de los grupos control, tratados con haloperidol y tratados con risperidona (estos últimos como representantes de los antipsicóticos típicos y atípicos respectivamente).

El recuento de los astrocitos marcados se efectuó en el microscopio, a los mismos aumentos en cada una de las áreas seleccionadas, si bien las superficies de análisis no eran idénticas, pues en el caso del núcleo Accumbens era de unas 300 mil micras cuadradas (0,3 mm²) y en el caso de la corteza cingular de unas 400 mil micras cuadradas (0,4 mm²). Como quiera que en las preparaciones los núcleos de los astrocitos no se aprecian, se exigió la convergencia de tres o más prolongaciones para poder contar un astrocito. En la corteza cingular decidimos excluir de la medición la capa superficial del córtex ya que mostraba una reactividad semejante en los diferentes grupos de animales.

Sobre los datos obtenidos se efectuó un análisis de la varianza (ANOVA) mediante el programa SPSS versión 19.