

10. Giorgio BIGNAMI. — **Influenza della L-Tiroxina e del metiltiouracile sul condizionamento e la ritenzione nel ratto.**

Riassunto. — In ratti adulti trattati con l-Tiroxina, con metiltiouracile e con metiltiouracile + l-Tiroxina sono state studiate le curve di condizionamento e di ritenzione di un comportamento di evitamento (avoidance response) nella gabbia di Warner.

I dati ottenuti indicano come lo stato di ipotiroidismo da metiltiouracile, pur senza modificare notevolmente le curve quotidiane di condizionamento, influisca negativamente sulla ritenzione da ciascun giorno di prove al successivo.

L'iniezione di l-Tiroxina non ha provocato da sola modificazioni statisticamente significative delle risposte dei ratti normali; somministrata a ratti in stato di ipotiroidismo da metiltiouracile, la l-Tiroxina, alle stesse dosi, non solo ha annullato l'effetto dell'antitiroideo ma ha portato a prestazioni persino superiori a quelle dei controlli, sia per quanto concerne le curve quotidiane di condizionamento, sia per quanto concerne la ritenzione.

Summary. — The present study investigated the acquisition and retention of an avoidance response in adult rats treated with l-Thyroxine, methylthiouracil and methylthiouracil plus l-Thyroxine. The apparatus used was a modified Warner automatically programmed shuttle cage.

The data obtained indicate that hypothyroidism, although not affecting acquisition during any day's trials, retards retention as measured on the early trials of successive daily tests.

Injectons of l-Thyroxine did not significantly modify the behaviour of otherwise untreated rats. In hypothyroid rats however, injections of l-Thyroxine not only eliminated the impairing effects of the deficiency, but seemed to facilitate during the early trials both acquisition and retention in comparison with control rats.

Oltre che dagli effetti sul metabolismo basale e sulla crescita, i quali sono stati particolarmente studiati nell'animale da esperimento, gli ormoni tiroidei sono caratterizzati da un'azione importante sulle funzioni corticali.

Sono noti, in clinica, i fenomeni di deficit psichico che accompagnano gli stati di ipotiroidismo, come anche gli effetti terapeutici degli estratti tiroidei su questi sintomi.

Lo studio dell'influenza sulle funzioni corticali degli stati di iper- ed ipotiroidismo artificialmente provocati nell'animale di laboratorio ha dato luogo a risultati in parte contraddittori (¹, ²).

Per questo motivo ci siamo proposti di riprendere in esame tale problema nel ratto, studiando le curve di condizionamento e di ritenzione in animali in stato di ipo- o ipertiroidismo sperimentale.

MATERIALI E METODI

Per le esperienze ci siamo serviti di 48 ratti Wistar albinì di sesso maschile. Gli animali provenivano da 12 portate allevate separatamente e scelte fra quelle che presentavano almeno 4 maschi. I quattro gruppi di 12 animali (I a IV) sono stati successivamente costituiti assegnando a ciascuno un elemento di ogni portata.

I ratti avevano un'età media di 73,8 (70 a 76) giorni ed un peso corporeo medio di 230 grammi all'inizio delle prove di condizionamento.

Gli animali sono stati addestrati ad una reazione condizionata di evitamento (shuttling response). L'apparecchio usato è costituito da una gabbia di Warner con pavimento di griglia metallica, di cui ciascuna metà viene alternativamente percorsa da una corrente elettrica, che rappresenta per l'animale lo stimolo che provoca la reazione incondizionata di fuga.

Lo stimolo incondizionato consiste in una scossa elettrica di 1,5 mA. Lo stimolo condizionante è costituito da una luce di durata variabile, che rimane accesa sino alla risposta motoria, condizionata o incondizionata.

L'intervallo di tempo che separa l'inizio dello stimolo condizionante dall'inizio dello stimolo incondizionato è di 5 secondi ed il ciclo completo della stimolazione viene regolarmente ripetuto ad intervalli di 30 secondi per 50 volte al giorno. Per la programmazione e la registrazione delle risposte dell'animale viene adoperato un dispositivo interamente automatico (³, ⁴, ⁵).

PARTE SPERIMENTALE

Adoperando i tests precedentemente messi a punto per lo studio del condizionamento e della ritenzione è stato ricercato l'effetto della somministrazione della l-Tiroxina, da una parte, e di un antitiroideo, il metiltiouracile, dall'altra.

I gruppi sperimentali sono stati i seguenti:

I - *Controlli*. I ratti hanno ricevuto per via sottocutanea 0,5 cm³ per 100 grammi di peso corporeo di una soluzione isotonica di cloruro di

sodio, una volta al giorno per 10 giorni, nelle stesse condizioni indicate per il gruppo successivo.

II - *l-Tiroxina*. La *l-Tiroxina* è stata iniettata per via sottocutanea alla dose di 0,2 mg/kg una volta al giorno, in soluzione salina isotonica (*l-Tiroxina* 0,04‰, NaCl 9‰, NaOH 0,001 N), per i 5 giorni precedenti l'inizio delle prove di condizionamento e per i 5 giorni nei quali queste si sono svolte.

III - *Metiltiouracile*. Il metiltiouracile è stato somministrato mescolando il prodotto nella proporzione dell'1‰ nell'acqua da bere, per 14 giorni prima delle prove di condizionamento e per tutta la durata delle medesime. Come nei controlli gli animali hanno ricevuto la soluzione isotonica di cloruro di sodio per iniezione.

IV - *Metiltiouracile + l-Tiroxina*. I ratti hanno ricevuto il metiltiouracile nell'acqua da bere per 14 giorni prima dell'inizio della serie di iniezioni di *l-Tiroxina* e per tutto il periodo delle medesime. La *l-Tiroxina* è stata somministrata come nel gruppo II.

Un primo controllo degli effetti fisiologici provocati da tale trattamento sulla funzione tiroidea è stato effettuato sacrificando gli animali il giorno successivo all'ultima prova di condizionamento e pesando le tiroidi con una bilancia a torsione.

In rapporto al peso medio nei controlli (gruppo I) le tiroidi degli animali trattati con *l-Tiroxina* hanno dimostrato una perdita di peso del 35,5% in media (Gruppo II), le tiroidi degli animali trattati con metiltiouracile una iperplasia fino a 154,1% (Gruppo III) mentre gli animali trattati con metiltiouracile + *l-Tiroxina* esibivano un peso tiroideo pressochè normale (Gruppo IV) (Tabella I) (*).

I diversi trattamenti, per contro, non hanno influito sul peso corporeo degli animali: le medie ponderali nei gruppi II, III e IV sono regolarmente aumentate come quella dei controlli. Tale reperto si spiega col fatto che in nessun caso i trattamenti sono iniziati prima del 51° giorno di età, cioè troppo tardi per provocare le ben note alterazioni dell'accrescimento legate particolarmente agli stati di ipotiroidismo.

Nelle condizioni descritte e nei vari gruppi di animali le prove eseguite nella gabbia di Warner hanno provocato un progressivo condizio-

(*) Da 4 gruppi di 5 animali ciascuno, appartenenti alle stesse portate, trattati parallelamente e sacrificati il giorno stesso dell'inizio delle prove di condizionamento si sono ottenuti dati assolutamente sovrapponibili.

TABELLA I

Peso medio delle tiroidi
(Animali sacrificati il giorno dopo l'ultima prova di condizionamento)

	Peso corporeo (g)	Peso della tiroide (mg/100 g di peso corporeo) (**)
gruppo I - Controlli	231,3	8,47 $\pm$ 1,50
gruppo II - l-Tiroxina	227,4	5,46 $\pm$ 0,91
gruppo III - Metiltiouracile	232,5	21,52 $\pm$ 3,77
gruppo IV - Metiltiouracile + l-Tiroxina . .	233,2	8,40 $\pm$ 2,00

(**) Media $\pm$ Deviazione Standard.

TABELLA II

Percentuali medie delle risposte condizionate e delle risposte totali

	Risposte condizionate							Somma delle risposte condi- zionate e in- condizionate	
	giorno I	giorno II	giorno III	giorno IV	giorno V	giorni I + II + III	giorni I + II + III + IV + V	giorni I + II + III	giorni I + II + + III + IV + V
Gr. I Controlli	7,8	28,8	47,8	54,4	62,0	28,1	40,2	98,6	99,2
Gr. II l-Tiroxina	3,4	22,2	41,4	52,4	58,8	22,3	35,6	86,2	87,8
Gr. III Metiltiouracile	9,6	11,0	27,3	27,8	35,6	16,0	22,3	73,5	72,1
Gr. IV Metiltiouracile + l-Tiroxina	14,6	50,3	59,6	61,8	64,2	41,5	50,1	90,4	92,8

namento dei ratti. Alla prima reazione incondizionata dell'animale che fugge la corrente elettrica rifugiandosi nella metà opposta della gabbia seguono in proporzione crescente le reazioni condizionate nelle quali i ratti, rispondendo allo stimolo luminoso condizionato, si spostano evitando la corrente.

Nella Tabella II sono indicate: a) le percentuali medie delle risposte condizionate date nei successivi giorni di prove dagli animali dei singoli

gruppi, b) le percentuali medie delle risposte totali (condizionate + incondizionate) (3, 4, 5).

Nell'analizzare ulteriormente i dati raccolti sono state scelte 5 portate, in cui tutti i fratelli avevano dato almeno l'84% del massimo teoricamente possibile di risposte totali. I dati per i ratti appartenenti a queste portate, suddivise nei 4 gruppi sperimentali, sono esposti graficamente nella Figura 1.

Dall'esame della tabella II e della figura 1 risulta:

1) come gli animali trattati con la l-Tiroxina (Gruppo II) abbiano dato una percentuale di risposte condizionate assai vicina, benchè leggermente inferiore, a quella data dagli animali del gruppo di controllo;

2) come la percentuale delle risposte condizionate e delle risposte totali sia particolarmente bassa per gli animali trattati con un antitiroideo (metiltiouracile, gruppo III) e come la media delle risposte ai primi dieci stimoli in ciascun giorno di prova sia molto inferiore a quella di tutti gli altri gruppi: il grado di ritenzione da un giorno al successivo, cioè, è assai basso;

3) come gli animali trattati sia con l'antitiroideo che con la l-Tiroxina (gruppo IV) abbiano fornito le prestazioni maggiori, mostrandosi superiori sia dal punto di vista delle medie delle risposte condizionate, sia dal punto di vista delle risposte condizionate date ai primi 10 stimoli in ciascun giorno di prove. Quest'ultimo reperto indica un alto grado di ritenzione del condizionamento da ciascun giorno di prove al successivo.

I dati numerici sono stati d'altra parte oggetto di un'accurata analisi statistica che permette di precisarne il significato.

In primo luogo l'analisi della varianza per i dati sommati dei primi tre giorni e per i dati sommati di tutte le prove (Tabella III) ha dimostrato come il procedimento sperimentale seguito abbia introdotto una variazione molto significativa ($p < 0,005$) e come vi sia un notevole grado di omogeneità entro le singole portate. Questo fatto risalta anche dal paragone fra i risultati indicati nella Tabella III, e quelli dell'analisi della varianza eseguita utilizzando i dati come se provenissero da gruppi sperimentali costituiti da animali distribuiti a caso (*).

I risultati della « trend analysis » (6) eseguita sui dati raccolti nei primi tre giorni di prove hanno dimostrato che, oltre ad esservi delle differenze importanti fra le medie delle risposte condizionate nei vari

(*) Per i dati sommati dei primi tre giorni: quadrati medi (varianze) 3.499,3 e 709,4 con 3 e 43 gradi di libertà, $F = 4,5099$, $p < 0,01$; per i dati sommati di tutte le esperienze: quadrati medi (varianze) 10.012,0 e 2239,5, con 3 e 43 gradi di libertà, $F = 4,4706$, $p < 0,01$.

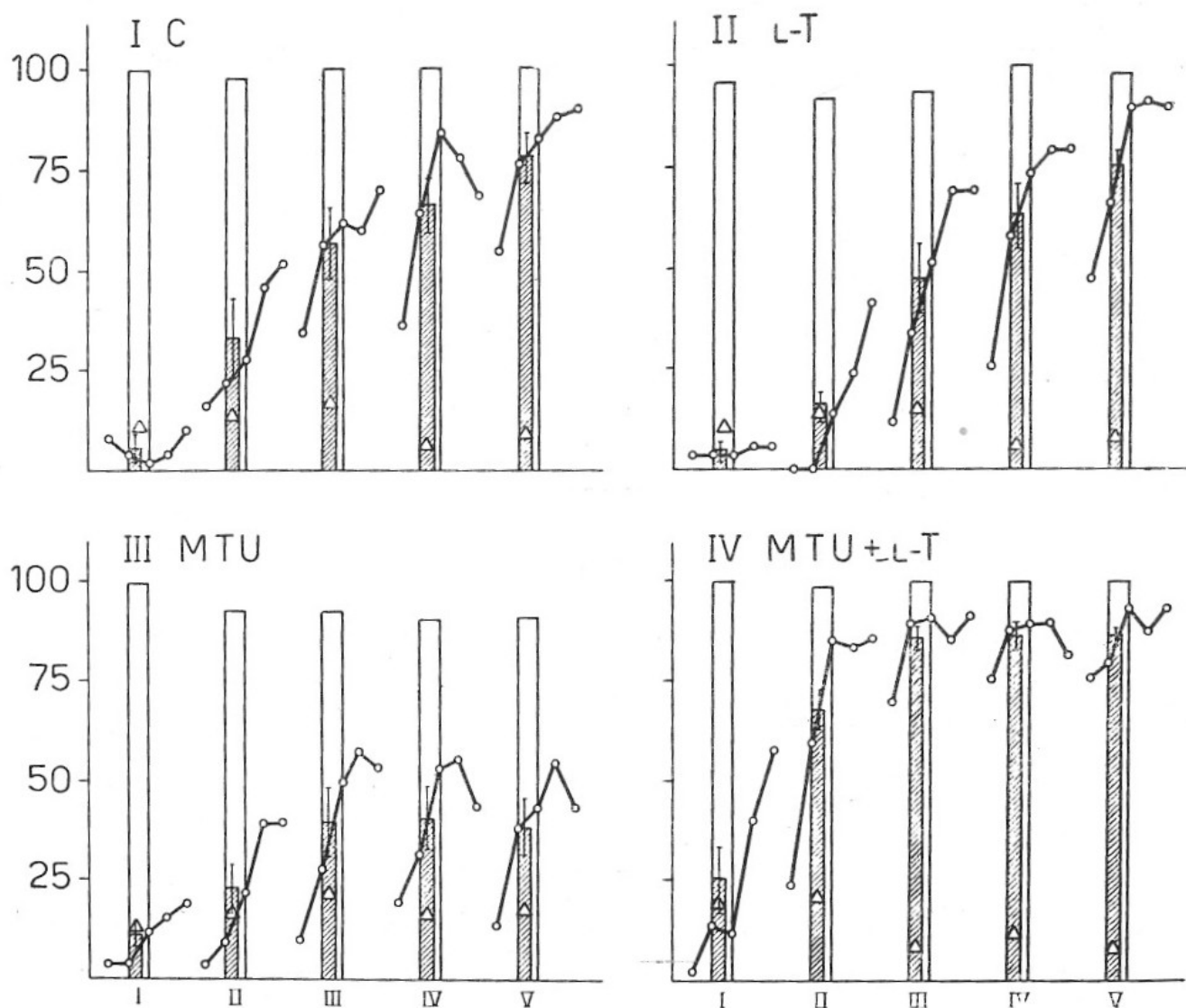


Fig. 1. - Curve di condizionamento del ratto alla reazione di evitamento (avoidance response) nella gabbia di Warner. Dati di cinque prove quotidiane successive (I a V) di 50 cicli consecutivi ciascuna.

I C — Controlli

II L-T — l-Tiroxina (0,2 mg/kg al giorno)

III MTU — Metiltiouracile (1 ‰ nell'acqua da bere)

IV MTU + L-T — Metiltiouracile + l-Tiroxina

Le colonne tratteggiate corrispondono alle percentuali delle risposte condizionate con i rispettivi errori standard; le colonne bianche alle percentuali delle risposte totali (condizionate + incondizionate). I triangoli bianchi indicano le percentuali di cicli di condizionamento che comportano una o più risposte addizionali. I tracciati che su ogni colonna riuniscono i cerchi bianchi corrispondono alle percentuali delle risposte condizionate nel corso di ognuno dei cinque periodi di dieci cicli che costituiscono la prova (3, 4, 5). Fra le 12 portate ed i 48 ratti adoperati nelle prove sono state scelte le cinque portate i cui membri avevano fornito le più alte percentuali di attività globale (> 84%) in tutti i quattro gruppi sperimentali.

gruppi, l'andamento del condizionamento è diverso da un gruppo all'altro ($p < 0,01$). In altre parole, se si riuniscono fra di loro i punti che rappresentano le medie delle risposte condizionate nel I, nel II e nel III giorno per i singoli gruppi, si ottengono curve non soltanto distanti fra loro, ma anche non parallele.

Analisi della varianza

A) Sulle somme delle risposte condizionate date nei primi tre giorni di prove

Cause di variazione	Somma dei quadrati (devianza)	Gradi di libertà	Quadrato medio (varianza)	F	p
Tra gruppi	9.598,0	3	3.199,33	6,0362	< 0,005
Tra portate	13.543,5	11	1.231,23	2,3230	< 0,05
Errore	16.960,5	32 (*)	530,02		
Totale	40.102,0	46 (*)			

B) Sulle somme delle risposte condizionate date in tutte le prove

Cause di variazione	Somma dei quadrati (devianza)	Gradi di libertà	Quadrato medio (varianza)	F	p
Tra gruppi	30.036,0	3	10.012,00	6,9535	< 0,005
Tra portate	50.224,5	11	4.565,86	3,1711	< 0,01
Errore	46.075,5	32 (*)	1.439,85		
Totale	126.336,0	46 (*)			

(*) Ridotti di 1 unità per la presenza di un dato interpolato nel gruppo della l-Tiroxina (II) secondo la formula di Anderson e Yates (¹⁷).

Il test di DUNCAN (⁷) infine ci ha permesso di precisare il grado di significatività statistica delle differenze fra medie dei vari gruppi sperimentali. Per i dettagli rinviamo alla Tabella IV, nella quale ogni paragone fra medie è analizzato due volte, la prima utilizzando soltanto le risposte date nei primi tre giorni di prove, la seconda utilizzando tutte le risposte condizionate.

La differenza fra la media delle risposte date dai controlli e quella delle risposte date dagli animali trattati con l'antitiroideo è risultata statisticamente significativa, se si considera il totale delle risposte condizionate, ma non per i dati sommati dei primi 3 giorni. Le differenze

TABELLA IV

Differenze fra percentuali medie delle risposte condizionate nei vari gruppi sperimentali e loro valutazione statistica mediante il test di Duncan (7).

	Differenze fra percentuali medie			
	I + II + III giorno		I + II + III + IV + V giorno	
	differenza	p	differenza	p
IV Vs III: (metiltiouracile + l-Tiroxina) meno (metiltiouracile)	25,5	< 0,001	27,8	< 0,001
IV Vs II: (metiltiouracile + l-Tiroxina) meno (l-Tiroxina)	19,2	< 0,01	14,5	< 0,05
IV Vs I: (metiltiouracile + l-Tiroxina) meno (controlli)	13,4	< 0,05	9,9	> 0,1
I Vs III: (controlli) meno (metiltiouracile)	12,1	> 0,05	17,9	< 0,01
II Vs III: (l-Tiroxina) meno (metiltiouracile)	6,3	> 0,1	13,3	< 0,05
I Vs II: (controlli) meno (l-Tiroxina)	5,8	> 0,1	4,6	> 0,1

fra gli animali del IV gruppo (metiltiouracile + l-Tiroxina) e quelle del II (l-Tiroxina) e ancor più del III (metiltiouracile) sono risultate tutte significative. Non sono significative invece le differenze fra le prestazioni dei controlli e quelle degli animali trattati con la sola l-Tiroxina, mentre lo è solo per i dati sommati dei primi tre giorni, e non per il totale delle risposte, la differenza fra i gruppi IV (metiltiouracile + l-Tiroxina) ed I (controlli).

DISCUSSIONE

Nelle esperienze riportate dall'abbondante letteratura sui rapporti fra tiroide e comportamento sono stati adoperati diversi metodi d'indagine, che sono però ben lontano dall'avere tutti lo stesso valore ai fini della valutazione degli effetti dell'ormone tiroideo e della tiroidectomia sul sistema nervoso centrale.

E' stato in particolare sottolineato come nelle tecniche nelle quali interviene una motivazione basata sulla ricerca del cibo da parte dell'animale l'interpretazione dei risultati sia resa complessa dall'importanza degli effetti metabolici provocati dall'ormone.

E' per questa ragione che menzioneremo soltanto alcuni dati ottenuti con diversi tipi di labirinti (⁸, ⁹, ¹⁰) e nelle gabbie tipo Skinner per lo studio della risposta operativa (¹¹, ¹²).

Nel caso particolare degli effetti dell'ormone tiroideo, lo studio dell'addestramento ad una reazione condizionata di evitamento, pur non essendo al riparo da ogni critica, offre evidenti vantaggi. In questo campo i dati della letteratura si presentano in più o meno ugual numero con conclusioni chiaramente positive o al contrario negative o dubbie. In quest'ultimo gruppo figurano i dati di BURNHAM e LEONARD (¹³, ¹⁴) e di MORRISON e CUNNINGHAM (¹⁵). I risultati da noi precedentemente riportati confermano invece quelli di RICHARDS e STOCKBURGER (¹⁶), i quali hanno messo in evidenza un effetto della somministrazione di tiroide o di tiouracile sull'addestramento ad una reazione condizionata di evitamento in una gabbia di Warner. Il dispositivo adoperato è stato pertanto molto simile a quello di cui noi ci siamo serviti, seppure con notevoli differenze nel procedimento sperimentale. Gli Autori, infatti, hanno fatto eseguire ai ratti 10 prove al giorno sino al raggiungimento di un criterio (10 risposte condizionate consecutive); l'intervallo fra stimolo condizionante (luce) e stimolo incondizionato (corrente elettrica) è stato di soli 2 secondi; i farmaci (tiroide essiccata in un gruppo, tiouracile in un altro) sono stati mescolati al cibo, e, nei giorni di prova, somministrati in una sola volta dopo l'esperienza: pertanto gli animali hanno eseguito le prove dopo circa 24 ore di digiuno. I risultati, comunque, sono molto simili a quelli da noi ottenuti per quanto riguarda i ratti trattati col tiouracile, che hanno raggiunto il criterio dopo un numero di prove assai maggiore che non i controlli.

Gli Autori hanno anche potuto mettere in evidenza prestazioni migliori nei ratti trattati con la tiroide essiccata che nei controlli, mentre nelle nostre esperienze un'azione della l-Tiroxina è stata dimostrata soltanto in animali trattati con un antitiroideo, ma non in animali normali. Le differenze nei procedimenti sperimentali seguiti, e verosimilmente differenze di ceppo degli animali adoperati, possono forse rendere conto di questa discordanza.

Per quanto riguarda i risultati delle prove da noi eseguite, l'analisi statistica ha dimostrato l'esistenza di differenze non soltanto quantitative, ma anche qualitative, fra le performances dei diversi gruppi. Dalla « trend analysis » è risultato infatti che le curve di condizionamento non sono parallele, ma possiedono nei diversi gruppi andamenti sostanzialmente diversi. Questo fatto può essere interpretato ricordando che, in relazione allo schema di sperimentazione scelto, i risultati esprimono: 1) da una parte la velocità di condizionamento, che appare in modo particolarmente chiaro all'esame di ciascuna delle curve quotidiane prese

separatamente; 2) d'altra parte il tipo di ritenzione, espresso dalla differenza fra le risposte condizionate agli ultimi 10 stimoli di ogni prova quotidiana e quelle date nei primi dieci cicli di condizionamento del giorno successivo.

La possibilità di distinguere fra questi due aspetti appare con sufficiente chiarezza nel confronto fra il gruppo degli animali trattati con metiltiouracile (III) ed il gruppo dei controlli (I). Mentre la differenza fra il totale delle risposte condizionate dei primi tre giorni non è significativa, essa è statisticamente significativa per l'insieme dei 5 giorni di esperienze, dimostrando che tali differenze possono essere messe a carico della ritenzione durante i periodi considerati piuttosto che dell'apprendimento quotidiano.

Si può quindi concludere che l'influenza dello stato funzionale della tiroide sul sistema nervoso centrale sembra esplicarsi attraverso due diverse modalità.

La somministrazione di ormoni tiroidei (risultati di Richards e Stockburger; gruppo IV delle nostre esperienze) sembra in grado di influire favorevolmente sia sui processi di apprendimento che sulla ritenzione; l'assenza o la deficienza di ormoni tiroidei sembra per contro influire negativamente soprattutto sulla ritenzione, senza che siano sostanzialmente modificate le curve quotidiane di condizionamento.

CONCLUSIONI

I dati che abbiamo esposto ed i risultati dell'analisi statistica dimostrano come lo stato di ipotiroidismo provocato mediante la somministrazione prolungata di un antitiroideo possa influenzare l'addestramento dei ratti adulti ad una reazione condizionata di evitamento (avoidance response). Specialmente colpita sembra la ritenzione da ciascun giorno di prove al successivo, come lo indica il numero particolarmente basso di risposte condizionate ai primi dieci stimoli.

La l-Tiroxina invece, iniettata a dosi sicuramente capaci di indurre uno stato di ipertiroidismo, non ha provocato modificazioni notevoli delle curve di condizionamento di animali normali. Per contro in animali precedentemente sottoposti ad un trattamento prolungato con l'antitiroideo essa ha non solo annullato l'azione di questo, ma ha portato a prestazioni persino superiori a quelle dei controlli.

BIBLIOGRAFIA

- (1) MUNN N. L. - Handbook of Psychological Research on the Rat, Houghton Mifflin Company, New York (1930), pag. 347.
 - (2) EAYRS J. T. - Brit. med. Bull., 16: 122 (1960).
 - (3) BOVET D., GATTI G. L., PECORI-GIRALDI J. e FRANK M. - Neuropsychopharmacology Vol. 2 (Ed.: E. Rothlin), Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1961) p. 143.
 - (4) BOVET D., GATTI G. L. e FRANK M. - Sci. Repts. Ist. sup. Sanità, 1: 127 (1961).
 - (5) FRANK M., GATTI G. L. e BOVET D. - Sci. Repts. Ist. sup. Sanità, 1: 139 (1961).
 - (6) EDWARDS A. L. - Experimental Design in Psychological Research, Rinehart & Company, New York; Revised Ed. (1960), pag. 227.
 - (7) EDWARDS A. L. - Ibidem, pag. 136.
 - (8) RICKEY E. - Comp. Psychol. Monog., 2: (1925).
 - (9) ROCKWELL J. G. - Psychol. Bull., 28: 222 (1931).
 - (10) BRODY E. B. - J. comp. Psychol., 34: 213 (1942).
 - (11) DENENBERG V. H. e MYERS R. D. - J. comp. physiol. Psychol., 51: 213 (1958).
 - (12) DENENBERG V. H. e MYERS R. D. - J. comp. physiol. Psychol., 51: 311 (1958).
 - (13) BURNHAM R. W. - Psychol. Bull., 37: 463 (1940).
 - (14) BURNHAM R. W. e LEONARD S. L. - J. comp. Psychol., 31: 233 (1941).
 - (15) MORRISON G. W. e CUNNINGHAM B. - J. comp. Psychol., 31: 413 (1941).
 - (16) RICHARDS W. J. e STOCKBURGER J. C. - J. comp. physiol. Psychol., 51: 445 (1958).
 - (17) BURN J. H., FINNEY D. J. e GOODWIN L. G. - Biological Standardization, Oxford University Press. London, 2^a ediz. (1952) p. 61.
-