

**Patrón de activación de sustratos neuronales (evidenciado por la expresión de la proteína Fos) en ratas Wistar expuestas a dos niveles de iluminación ambiental en el Laberinto en Cruz Elevado bajo el efecto de una benzodiacepina.**

**Diana Pilar Martínez Rangel, BSc.**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Salud**

**Escuela de Medicina**

**Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Bucaramanga, 2013**

**Patrón de activación de sustratos neuronales (evidenciado por la expresión de la proteína Fos) en ratas Wistar expuestas a dos niveles de iluminación ambiental en el Laberinto en Cruz Elevado bajo el efecto de una benzodiacepina.**

**Diana Pilar Martínez Rangel, BSc.**

Proyecto presentado como requisito para obtener el título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas, especialidad en Neurociencias.

Director

**Carlos Arturo Conde Cotes, M.D., M. Sc., Ph.D.**

Universidad Industrial de Santander

Codirectora

**Andrea Milena García Becerra, Psi., M. Sc., Ph.D.**

Universidad de la Sabana

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Salud**

**Escuela de Medicina**

**Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Bucaramanga, 2013**

## **Agradecimientos**

*“Leer para saber y escribir para comprobar si estamos entendiendo bien.”*

En este proceso de aprendizaje se involucran tantas personas que será difícil hacer justo reconocimiento a todos los que han dedicado parte de su tiempo en compartir su conocimiento. Para iniciar agradezco el continuo apoyo de los integrantes del grupo de Neurociencias y Comportamiento UIS-UPB, en cabeza del profesor Carlos Conde y la profesora Silvia Botelho, por confiar en mis ideas y permitir el espacio y las herramientas para explorar y aprender de neurociencias. Agradezco los acertados consejos de los profesores Luis Carlos Orozco y Marta Dallos y la continua charla con mis compañeros Gina Pineda, Cesar Celis, Manuel Mejía y Yesith Toloza.

Al Laboratorio de Bases Biológicas del Comportamiento en la Universidad de La Sabana y a la codirección de la profesora Andrea García, ya que gracias al trabajo en conjunto se desarrolló parte importante de la investigación. Al Laboratorio de Neurofisiología del Comportamiento en la Universidad Nacional de Colombia, que facilitaron sus instalaciones y elementos para el avance de este trabajo de investigación.

Al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología en la Universidad Industrial de Santander, al profesor Rodrigo Torres así como a los investigadores Marilyn Alvarez, Jennifer Tibaduiza y Víctor Hernández quienes estuvieron presentes en ciertas fases del proyecto.

A Jesús Rodríguez, porque su preocupación por el bienestar de los roedores nos permite trabajar con animales en óptimas condiciones, así como su ayuda en la toma de muestras.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS por el apoyo financiero.

Finalmente a mi familia por estar siempre cerca, por ser el soporte en todo momento, por creer en mis proyectos.

## Contenido

<b>Introducción</b> .....	13
<b>Planteamiento del Problema de Investigación</b> .....	18
<b>Objetivo General</b> .....	20
<b>Experimento 1</b> .....	20
Hipótesis.....	21
Materiales y Métodos.....	21
Procedimiento.....	23
<b>Experimento 2</b> .....	26
Hipótesis.....	27
Materiales y Métodos.....	27
Procedimiento.....	27
<b>Análisis estadístico</b> .....	29
<b>Resultados</b> .....	32
<b>Discusión</b> .....	44
<b>Conclusión</b> .....	51
<b>Bibliografía</b> .....	52
<b>Anexos</b> .....	59

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Distribución de los grupos experimentales .....	23
<b>Tabla 2.</b> . Resultado estadístico del análisis de Razones de Riesgo instantáneo de las entradas al brazo abierto del laberinto, a los 5 minutos de experimento. ....	37
<b>Tabla 3.</b> Resultado estadístico del análisis de Razones de Riesgo instantáneo de las entradas al brazo abierto del laberinto, a los 15 minutos de experimento ....	38
<b>Tabla 4.</b> Resultados regresión lineal múltiple del número de neuronas marcadas para Fos (promedio de células/0.1 mm <sup>2</sup> ) y la influencia de las variables estudiadas.....	41
<b>Tabla 5.</b> Resultados regresión lineal múltiple del nivel de corticosterona en plasma y la influencia de las variables estudiadas. ....	42
<b>Tabla 6.</b> Valores de concentración plasmática de corticosterona.....	43

## Lista de Gráficas

<b>Figura 1.</b> Curva de calibración utilizada para extrapolar desde el valor de absorbancia de las muestras la concentración de corticosterona.....	29
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de entradas a los brazos abiertos, tiempo en los brazos abiertos y entradas al extremo de los brazos abiertos.....	33
<b>Figura 3.</b> Tiempo en el extremo de los brazos abiertos, frecuencia de valoración del riesgo, tiempo de valoración del riesgo y entradas a los brazos cerrados.....	34
<b>Figura 4.</b> Curvas Kaplan-Meier Estimación de Sobrevida a los 5 minutos de experimento a partir de las entradas a los brazos abiertos del laberinto.....	35
<b>Figura 5.</b> Curvas Kaplan-Meier Estimación de Sobrevida a los 15 minutos de experimento a partir de las entradas a los brazos abiertos del laberinto.....	36
<b>Figura 6.</b> Estimados suavizados de riesgo instantáneo de las entradas a los brazos abiertos del laberinto, a los 5 minutos de experimento.....	38
<b>Figura 7.</b> Riesgo instantáneo de las entradas a los brazos abiertos del laberinto, a los 15 minutos de experimento.....	39
<b>Figura 8.</b> Razón de las neuronas marcadas para Fos (promedio de células /0.1 mm <sup>2</sup> ) en cada una de las variables evaluadas.....	41
<b>Figura 9.</b> Concentración de corticosterona plasmática en cada uno de los grupos.....	43
<b>Figura 10.</b> Razón de la concentración de corticosterona en sangre en cada una de las variables evaluadas.....	31

## **Lista de Anexos**

<b>Anexo A.</b> Obtención de la concentración de corticosterona plasmática. ....	60
<b>Tabla 1.</b> Descripción de los nombres utilizados.....	60
<b>Tabla 2.</b> Valores de absorbancia medidos y ajustados.....	60
<b>Tabla 3.</b> Parámetros de la ecuación.....	60
<b>Anexo B.</b> Experimento 1. Resultados Variables Comportamentales.....	63
<b>Tabla 1.</b> Descripción de los nombres utilizados.....	63
<b>Tabla 2.</b> Resultados estadísticos de Anova de una vía aplicada a los grupos experimentales.....	63
<b>Anexo C.</b> Imágenes de los cortes realizados .....	85

## Resumen Español

TITULO: Patrón de activación de sustratos neuronales (evidenciado por la expresión de la proteína Fos) en ratas Wistar expuestas a dos niveles de iluminación ambiental en el Laberinto en Cruz Elevado bajo el efecto de una benzodiazepina.

AUTOR: Diana Pilar Martínez Rangel\*\*

Palabras clave: Laberinto en Cruz Elevado, iluminación, proteína Fos, sistema límbico

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de la iluminación ambiental sobre el comportamiento, la expresión de la proteína Fos y la corticosterona plasmática de ratas Wistar expuestas al Laberinto en Cruz Elevado (LCE). Adicionalmente se evaluó el efecto ansiolítico de la benzodiazepina tanto en un ambiente iluminado como en oscuridad extrema. Para esto se realizaron dos experimentos consecutivos evaluando un total de 128 ratas Wistar machos. Los resultados encontrados mostraron que al evaluar los animales en oscuridad, estos presentaron mayor exploración de los Brazos Abiertos (BA) del LCE. Este patrón de exploración no fue congruente con la disminución en los niveles de ansiedad. Se observó que la oscuridad retrasó la evitación por las zonas potencialmente peligrosas, lo cual puede explicarse por disminución en el acceso de información visual asociada a la generación del estado ansioso. La expresión de la proteína Fos en las áreas evaluadas demostró una activación similar en estructuras del sistema límbico en los diferentes niveles de iluminación. El núcleo paraventricular del tálamo mostró una mayor actividad en animales evaluados en oscuridad. Esta activación puede asociarse a su función en la regulación de ritmos circadianos sincronizados por la luz, específicamente con la información sensorial asociada a oscuridad y el ciclo de vigilia de este tipo de roedor nocturno. De igual manera el aumento en concentración de corticosterona plasmática, apoya la hipótesis de que los dos ambientes de iluminación promueven la generación de mecanismos defensivos.

Tomando en conjunto estos resultados sugieren que el acceso a información ambiental permite la evaluación del riesgo asociado a los espacios abiertos, mas no únicamente a la cantidad de luz.

\*\*Facultad de Salud, Escuela de Bacteriología, Carlos Conde, Andrea Milena García.

## **Abstract**

TITLE: Neural activation pattern (by Fos protein expression) in Wistar rats exposed in two environmental illuminations levels in the Elevated Plus Maze, under effect of a benzodiazepine.

AUTOR: Diana Pilar Martínez Rangel\*\*

Key words: Elevated Plus Maze, illumination, Fos protein, limbic system.

This study aims to examine the environmental illumination effect on the anxiety-like behavior, Fos protein expression and plasma corticosterone level on Wistar rats exposed to Elevated Plus Maze (EPM). In addition, we assess the anxiolytic effect of a benzodiazepine in light and darkness. Two consecutive experiments were performed in 128 male rats. Animals evaluated in darkness displayed a higher exploration of the EPM Open Arms (OA). Darkness delayed the avoidance for potentially dangerous EPM areas, which may be explained by decreased access to visual information associated with the generation of anxious-like state. The expression of Fos protein in areas of limbic system showed similar activation without direct relation to illumination level. The paraventricular nucleus of thalamus showed a significant increase of Fos protein expression in rats tested in darkness. This activation can be associated with the function of this nucleus in regulation of circadian rhythms synchronized by light. Specifically, this structure is related with the sensorial information associated to darkness and wake cycles of this kind of nocturnal rodent. In addition, the increase in plasma corticosterone level, support the hypothesis that two environments promote the generation of defensive mechanisms. These results suggest that access to sensory information, not only light, allows the evaluation of risks associated with open spaces.

\*\*Facultad de Salud, Escuela de Bacteriología, Carlos Conde, Andrea Milena García.

## Introducción

### Caracterización experimental de ansiedad

La Asociación Americana de Psiquiatría en su manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales (DSM-IV) define los criterios que delimitan los trastornos de ansiedad, para cada uno de ellos se indican los síntomas que deben presentarse, así como su duración. La ansiedad ha sido asociada con un diverso rango de síntomas que son desencadenados por una variedad de situaciones, entre sus trastornos se incluyen ansiedad generalizada, pánico, ansiedad social, ansiedad por separación, agorafobia, fobia específica, trastorno de estrés postraumático y trastorno obsesivo compulsivo.

La ansiedad es considerada una reacción normal frente a situaciones que generan amenaza, funciona como un detonador fisiológico de protección que facilita la confrontación al factor estresante, generando comportamientos adecuados con la situación, como escape o evitación, por otra parte, la ansiedad patológica es caracterizada por una experiencia excesiva en ausencia de amenaza o una respuesta no adecuada con el entorno, lo que se ha asociado con comportamientos no adaptativos (Singewald, 2007), que además pueden aumentar la susceptibilidad a un amplio rango de desórdenes psiquiátricos (Yehuda, 2001). La ansiedad se acompaña de cambios en la función del sistema nervioso autónomo, incluyendo aumento de la frecuencia cardiaca, presión sanguínea, aumento de la frecuencia respiratoria y cambios en la conductancia de la piel (Depino y Gross, 2007). De igual manera se han observado cambios en la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, representado por un aumento en los niveles de glucocorticoides en plasma, respuesta asociada a estrés (Albrechet-Souza *et al.*, 2007). Algunas de estas alteraciones en la actividad autonómica y endocrina frente a estímulos aversivos han sido utilizadas para inferir el estado emocional de roedores, que al exponerlos a situaciones de conflicto, miedo condicionado o de aversión

espontánea, modelan varios de los síntomas observados en humanos, todo esto para obtener un mejor entendimiento de la neurobiología de la ansiedad (Clement y Chapouthier, 1997).

La caracterización experimental de los mecanismos que modulan los estados ansiosos ha sumado evidencia de las bases neuronales, circuitos cerebrales y sistemas de neurotransmisión implicados. Tal vez la estructura del sistema límbico que más fácilmente se asocia con comportamientos defensivos es la amígdala, dado el gran número de estudios que muestran su participación en el procesamiento emocional (Cardinal, 2002, Phelps y LeDoux, 2005, Bueno *et al.*, 2005, Hale *et al.*, 2006), neuroanatómicamente comprende varios sub núcleos conocidos en conjunto como complejo amigdalino, los cuales son agrupados por sus características citoarquitectónicas y funcionales. Dos de estas unidades han sido implicadas en el control del procesamiento emocional, el núcleo central (CeA) y el núcleo basolateral de la amígdala (BLA), este último comprende los núcleos lateral, basal y núcleos accesorios, proyecta en buena medida al estriado ventral y al núcleo central, y se ha asociado con la detección y validación del estímulo o amenaza (Moreira *et al.*, 2007). El núcleo central tiene proyecciones extensas al hipotálamo, a la formación reticular y al tallo cerebral, su actividad ha sido asociada con respuestas comportamentales, autonómicas y neuroendocrinas (Cardinal *et al.*, 2002). De igual manera otras estructuras neuronales interconectadas entre sí, han sido descritas como sustrato neuronal de ansiedad al estar relacionadas con en el desarrollo de respuestas defensivas. El hipocampo, que está altamente interconectado con el septum conecta asimismo con locus coeruleus, el núcleo del rafe, el hipotálamo, la amígdala y la corteza medial prefrontal (Amaral y Witter, 1995). La inhibición de la actividad en hipocampo ha permitido advertir una disminución en la reactividad de los animales expuestos al Laberinto en Cruz Elevado (LCE) y al test de interacción social (Rezayat *et al.*, 2005). La corteza medial prefrontal es una región heterogénea que contiene áreas como la corteza prelímbica, corteza infralímbica y la corteza cingulada

anterior, tiene proyecciones a núcleo accumbens, amígdala y otras regiones límbicas, por medio de las cuales se ejerce control sobre comportamientos de búsqueda de recompensa. Lesiones en la corteza medial prefrontal o su inhibición por agonistas del receptor GABA<sub>A</sub>, aumentan la actividad de exploración de los brazos abiertos (BA) en el LCE (Lacroix *et al.*, 2000). La corteza medial prefrontal conecta de manera recíproca con varios núcleos del tálamo, algunos involucrados en funciones viscerales y otros que participan en aspectos de atención y orientación del comportamiento (Van der Werf *et al.*, 2002). En tanto que por medio de las proyecciones de corteza medial prefrontal a hipotálamo se influyen comportamientos de miedo y defensa así como ciertas funciones autonómicas (Floyd *et al.*, 2001), el hipotálamo está altamente conectado con locus coeruleus, núcleo del rafe, sustancia gris periacueductal, amígdala, septum e hipocampo. Su inhibición temporal aumenta el tiempo en los BA del LCE y el tiempo de contacto en el test de interacción social, sugiriendo que hipotálamo es una estructura necesaria en la expresión de reacciones relacionadas con ansiedad (Jardim y Guimaraes, 2001, Jardim *et al.*, 2005). El septum comunica directamente con hipocampo y otras estructuras de prosencéfalo involucradas en ansiedad, su inhibición por infusión de un agonista del receptor GABA<sub>A</sub> ya sea en su porción medial o lateral, reduce comportamientos de tipo ansioso en el LCE (Degroot *et al.*, 2001). Se ha supuesto que el núcleo accumbens funciona como un intermedio entre el sistema motor y el sistema límbico, ya que se asocia con conductas motivadas y dirigidas a un objetivo, sumado a que recibe proyecciones de la corteza prefrontal ligadas a comportamientos de búsqueda de recompensa, está igualmente conectado con amígdala basolateral e hipocampo (Kelley, 1999). La sustancia gris periacueductal recibe y envía información de y hacia la mayor parte de estructuras cerebrales, muchas de ellas involucradas en miedo y ansiedad, como el locus coeruleus, núcleo del rafe, hipotálamo, amígdala, septum y la corteza prefrontal. La microinfusión de un agonista del receptor GABA<sub>A</sub> ya sea en su región dorsal o ventral, disminuye los comportamientos asociados con ansiedad, evaluado en el LCE así como en el test de vocalizaciones ultrasónicas

(Russo *et al.*, 1993, Walker y Carrive, 2003), de igual manera la lesión permanente de la sustancia gris periacueductal impide el desarrollo de respuestas de miedo a estímulos no condicionados (Behbehani, 1995).

### **Sistemas de neurotransmisión relacionados con ansiedad**

Como se puede advertir por lo expuesto previamente, el reconocimiento de la participación de tales estructuras en el desarrollo de comportamientos defensivos similares a ansiedad, se ha facilitado en gran medida por el uso de diversas estrategias, entre ellas la microinfusión de agonistas y antagonistas selectivos para algún tipo de receptor, a fin de estimular o inhibir estructuras específicas y de esta manera asociarlas con posibles funciones, la lesión de dichas estructuras neuronales también ha funcionado como un indicador de su participación, sin embargo este tipo de exploración aunque ha proporcionado información sobre el sustrato anatómico y neuroquímico subyacente a comportamientos defensivos, ha necesitado de otras herramientas para obtener información más detallada, entre estos están el desarrollo de animales knockout, registros electrofisiológicos, imagen por resonancia magnética funcional e inmunohistoquímica de genes de expresión rápida, uno de los últimos desarrollos tecnológicos que busca responder preguntas similares, es la optogenética, con la cual ya se han explorado tanto la activación como inhibición de neuronas en estructuras específicas y su influencia en el desarrollo de estados emocionales (Kim *et al.*,2013, Jennings *et al.*,2013).

El reconocimiento de las diversas estructuras y circuitos asociados con ansiedad ha sido ayudado por el estudio de los sistemas de neurotransmisión implicados en su desarrollo, el principal interés se ha centrado en los sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos y GABAérgicos. La propuesta principal en el sistema noradrenérgico es que una liberación aumentada de noradrenalina conlleva a la generación de ansiedad o a una activación disfuncional, la evidencia que sostiene esta relación incluye el efecto ansiogénico de sustancias que incrementan la disponibilidad de noradrenalina, como las anfetaminas y la cocaína (Louie *et al.*,

1989). En cuanto al sistema serotoninérgico, la evidencia no es tan clara y en ciertos casos es contradictoria, lo que ha llevado a concluir que hay diferentes circuitos neuronales serotoninérgicos y receptores mediando diferentes aspectos de ansiedad, entre estos dos sistemas principales se incluye por una parte el núcleo medial del rafe y por otra, el núcleo dorsal del rafe, involucrados al parecer en la modulación de miedo y ansiedad anticipatoria y en el desarrollo de respuestas de pánico respectivamente (Graeff *et al.*, 1996). Sustancias como el alcohol, los barbitúricos y las benzodiacepinas entre otras actúan a nivel del receptor GABA<sub>A</sub>, el cual está involucrado en neurotransmisión inhibitoria jugando un papel importante en la regulación de la excitabilidad neuronal. El uso de agonistas de este receptor produce ansiólisis en la mayoría de los modelos de ansiedad no condicionada, sugiriendo que este sistema de neurotransmisión está altamente involucrado en el control neuronal de la ansiedad.

### **Una herramienta para suscitar comportamientos defensivos**

En el estudio de la influencia de los diversos sistemas de neurotransmisión se han utilizado herramientas que promueven el desarrollo de comportamientos defensivos, uno de los más conocidos y utilizados es el LCE, este modelo está basado en la medición del comportamiento exploratorio de un ambiente novedoso compuesto por zonas abiertas, aversivas y potencialmente peligrosas, los BA y unas zonas cerradas, protegidas y potencialmente seguras, los brazos cerrados (BC). Dicho comportamiento exploratorio se caracteriza por un conflicto entre posturas de búsqueda de nueva información y comportamientos de evitación, evaluadas por medio de variables espacio temporales que son utilizadas con el fin de cuantificar el comportamiento y así generar índices de ansiedad (Pellow y File, 1986)

En 1993, Griebel *et al.*, exploraron ciertos factores metodológicos que podrían influenciar el comportamiento espontáneo de los animales al ser expuestos al laberinto, concluyendo que los índices obtenidos a partir de la exploración

evidenciarían un mayor nivel de ansiedad cuando los animales son expuestos en niveles de iluminación más altos, al ser evaluados en las horas de la tarde y al hacer una segunda exposición al laberinto entre dos horas hasta dos días después de la primera experiencia. Investigaciones previas ya habían mostrado para este momento la importancia de la iluminación como agente aversivo tanto en ratas como en ratones. De tal manera, se ha confirmado una clara influencia de la iluminación ambiental durante la prueba sobre el patrón comportamental de los animales. La explicación del peso que tiene la iluminación sobre el patrón de exploración del laberinto ha girado en torno a la asunción de miedo innato de los roedores a los espacios más iluminados y abiertos, dada sus características aversivas, es así como con la disminución en los niveles de iluminación se observa un aumento en las entradas relativas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos de los animales al ser expuestos al LCE.

### **Planteamiento del Problema de Investigación**

Este tipo de evidencia experimental, en la que se demuestra un aumento en las entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos del LCE cuando las ratas son evaluadas en oscuridad, ha llevado a proponer la vía visual como principal modalidad sensorial utilizada por los animales para obtener información durante la exposición al laberinto (Conde, *et al.*, 2001; Jones y King, 2001; Martínez, *et al.*, 2002; Bertoglio y Carobrez, 2002; Garcia, *et al.*, 2005). García y colaboradores (2005), proponen que la modificación en el comportamiento dado por la presencia de luz, se da a partir de un nivel de iluminación de 3 lux, por encima del cual no va a presentarse un aumento en la evitación dependiente de su intensidad. Como se mencionó anteriormente, estas modificaciones en los parámetros espacio-temporales utilizados como índices de ansiedad, también se evidencian al aplicar a los animales fármacos gabaérgicos como las benzodiazepinas, cuyo efecto principal es una mayor exploración de las zonas

potencialmente aversivas cuando los animales son expuestos por primera vez al laberinto (Pellow y File, 1986). Resultados anteriores en nuestro laboratorio han mostrado que evaluar esta clase de fármacos en una iluminación baja (9 lux), impide detectar el efecto de tipo ansiolítico de la benzodiazepina, pues en este nivel de iluminación ambiental pareciera revertirse la aversión generada por los brazos abiertos del laberinto (Conde, *et al.*, 2001). Recientemente se han reportado resultados similares al evaluarse en un nivel de iluminación de 0 lux, el efecto de dos dosis diferentes de clordiazepóxido, en el que no se encontraron diferencias con el grupo control (García *et al.*, 2011). Este tipo de investigaciones donde se ha evidenciado una mayor permanencia y exploración de los brazos abiertos del laberinto cuando los animales son evaluados en bajos niveles de iluminación han interpretado sus resultados por una parte, como la posibilidad de que una exploración aumentada de los animales bajo este tipo de condición ambiental pueda impedir la detección del efecto ansiolítico de los fármacos utilizados y por otra, como una exhibición de bajos niveles de ansiedad, sustentado en la posibilidad de que en ausencia del estímulo estresante, en este caso la luz, no se presente la activación de las estructuras que participan en el desarrollo de comportamientos de tipo ansioso.

En los roedores la fase del día sin presencia de luz corresponde al periodo donde tienen su principal actividad, esta mayor actividad nocturna debería estar asociada a un patrón comportamental donde se evidencien los diferentes niveles de defensa expuestos por Blanchard y Blanchard (1988), que se han sustentado como respuestas adecuadas frente al predador.

Es así como se pretende aportar a la discusión existente, realizando la comparación en el comportamiento, la activación neuronal y la concentración de corticosterona en plasma de animales evaluados en luz y en oscuridad extrema.

Con este fin se formulan las siguientes preguntas básicas:

1. ¿Cuando los animales son evaluados en oscuridad, evidencian comportamientos defensivos?
2. ¿Los mecanismos cerebrales que participan del desarrollo de comportamientos defensivos observados al evaluar los animales con iluminación, participan de forma diferente al evaluar los animales en oscuridad?
3. ¿En oscuridad la benzodiazepina utilizada ejerce su efecto ansiolítico?

### **Objetivo General**

El presente trabajo fue desarrollado con el objetivo de explorar la interacción de la iluminación ambiental y la aplicación de una benzodiazepina sobre el comportamiento, el patrón de activación de los sustratos neuronales y sobre la respuesta hormonal en ratas expuestas al laberinto en cruz elevado.

El primer experimento tuvo como objetivo específico evaluar el efecto de dos niveles de iluminación ambiental sumado a la aplicación de una benzodiazepina sobre el patrón comportamental y sobre la expresión de la proteína Fos en animales expuestos por primera vez al LCE.

El segundo experimento tuvo como objetivo específico evaluar el efecto de dos niveles de iluminación ambiental sumado a la aplicación de una benzodiazepina sobre la respuesta hormonal, evaluada por medio de los niveles de corticosterona en plasma, en animales expuestos por primera vez al LCE.

**Experimento 1: Influencia de la iluminación ambiental y la aplicación de una benzodiazepina sobre el patrón de activación de los sustratos neuronales evaluado por medio de la prueba inmunohistoquímica de expresión de la proteína Fos en ratas expuestas por primera vez al LCE.**

El sistema neuronal subyacente a los comportamientos defensivos en roedores ha sido centro de intensa búsqueda, como se mencionó anteriormente, una de las herramientas utilizadas con este objetivo es la expresión de genes tempranos, estos representan una clase de genes que responden de manera rápida y transitoria a una variedad de estímulos celulares. Uno de los primeros y más utilizados es el gen *c-fos*, se utiliza su expresión como una herramienta para estudiar la población neuronal que está asociada con procesos que conllevan a excitación, ya que la proteína Fos es expresada en respuesta a hormonas y neurotransmisores que inducen elevaciones de calcio y AMPc intracelular, la expresión de esta proteína es altamente sensible a la despolarización de la membrana y puede proporcionar un índice de respuesta funcional (Armario, 2006), no obstante, ni *c-fos* ni ningún otro gen de expresión rápida puede marcar células con sinapsis netas inhibitorias, por lo tanto no debe asumirse que al no marcarse un circuito se excluye su participación (Albrechet-Souza *et al.*, 2009)

### **Hipótesis**

Dado que en ausencia de estimulación sensorial, el cerebro generalmente expresa niveles basales bajos de la mayoría de genes de expresión rápida (Terleph y Tremere, 2006), la iluminación como factor sensorial disparador del proceso de aversión ha de generar una modificación en la activación de los sustratos neuronales que se presumen están involucrados con el desarrollo de comportamientos defensivos en los roedores, sumado a esto, si estos sustratos son modulados por neurotransmisión gabaérgica, se espera que con la aplicación de una benzodiazepina haya igualmente un cambio en la actividad de tales sustratos, esto evidenciado con el marcaje dado con la proteína Fos.

### **Materiales y Métodos**

Animales: Se utilizaron ratas Wistar macho, provenientes del Bioterio de la Universidad Industrial de Santander, con un peso de  $240 \pm 10$  g, alojadas de a seis animales por caja (Botelho, et al., 2007), con comida y agua a libre consumo,

en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, luces encendidas a las 7 a.m., a temperatura promedio de 23 °C y humedad relativa de 66 ± 5%.

Los animales fueron distribuidos en 8 grupos diferentes (ver tabla 1) de acuerdo a:

1. Nivel de iluminación ambiental durante la prueba, algunos animales fueron evaluados en oscuridad extrema, 0 lux, mientras que otros animales fueron evaluados en iluminación alta, 300 lux.
2. Al lugar al que fueron expuestos, algunos animales fueron evaluados en el LCE, mientras que otros fueron expuestos a una caja de acrílico, elevada a una altura similar al LCE, con esto se buscó definir la influencia del lugar en el que fueron expuestas las ratas sobre el conteo de núcleos positivos para la proteína Fos, y así definir el conteo dado únicamente por la exposición al laberinto.
3. Al tratamiento farmacológico utilizado, ya que algunos animales fueron evaluados bajo el efecto farmacológico de la benzodiacepina diazepam mientras que su grupo control fue inyectado con la solución vehículo, solución salina.

Como grupo control adicional, con el fin de evaluar el conteo de núcleos positivos para Fos propio de la cepa Wistar criada en el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, se utilizaron animales que antes de la perfusión no tuvieron ningún tipo de experiencia, solo fueron manipulados por un minuto durante tres días previos al inicio del experimento, así como los demás animales.

**Tabla 1.** Distribución de los grupos experimentales

Fármaco	LCE		No LCE (Caja de Acrílico)	
	Nivel de iluminación		Nivel de iluminación	
	0 LUX	300 LUX	0 LUX	300 LUX
Salina	8	8	8	8
Diazepam	8	8	8	8
<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>

Laberinto en Cruz Elevado: El laberinto es hecho de madera, consiste en cuatro brazos cruzados entre sí, dos de ellos con paredes laterales de 40 cm o brazos cerrados (BC) y dos brazos con un borde de acrílico de 1 cm o brazos abiertos (BA), todo esto elevado 50 cm sobre el suelo.

Tratamiento farmacológico: La benzodiacepina utilizada fue Valium® (DZP) (Roche) en concentración de 2mg/Kg, administrado intraperitonealmente 30 minutos previos a la exposición al laberinto. La solución en que fue diluido corresponde a solución salina 0.9 %, que fue utilizada como control.

**Procedimiento:** Los animales fueron expuestos al LCE durante 15 minutos (Silveira *et al.*, 1993, Beijamini y Guimaraes, 2006). Los dos niveles de iluminación corresponden a oscuridad extrema o 0 lux y a un nivel de iluminación alto de 300 lux. El grupo de animales evaluados sin la exposición al laberinto, fue ubicado individualmente en una caja de acrílico sobre una base elevada 50 cm del suelo, a fin de obtener el mismo nivel de iluminación que los animales evaluados con el laberinto, el tiempo de exposición en esta caja también fue de 15 minutos.

Las sesiones experimentales fueron grabadas utilizando una cámara de video con luz infrarroja, lo que permitió grabar en oscuridad extrema y de esta manera monitorear con un sistema para el posterior registro y procesamiento de comportamiento utilizando un conjunto de programas computacionales (Prostcom) elaborados para tal fin.

*Perfusión:* 90 minutos después de terminar la exposición al laberinto o a la caja de acrílico, todos los animales fueron profundamente anestesiados con Xilacina y Ketamina aplicadas intraperitonealmente en una dosis de 0.3 mg/Kg y 1 mg/Kg respectivamente. Una vez anestesiados fueron perfundidos vía aorta ascendente con 100 ml de buffer fosfato salino (pH 7.4), mediante una aguja 26G ubicada en el ventrículo izquierdo, seguido de 150 ml de solución de fijación, paraformaldehído al 4% (pH 7.4). Los cerebros fueron removidos y mantenidos en paraformaldehído al 4 % por 6-8 horas más. Luego fueron conservados en solución de sacarosa al 32% hasta ser congelados con isopentano. Los cerebros fueron mantenidos a - 20°C hasta que fueron cortados con el uso de un criostato(LEICA), en secciones transversales de 40 µm. Dichas secciones se conservaron en PBS con anticongelante y posteriormente fueron procesadas según el protocolo Avidina Biotina con el kit IgG Vectastain ABC peroxidasa.

*Técnica inmunohistoquímica para la detección de la proteína Fos:* Los cortes fueron inicialmente lavados con PBS 0.1 M y posteriormente incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% durante una hora, a fin de bloquear la peroxidasa endógena, para luego ser sometidos a 3 lavados de 5 minutos con PBS. Posteriormente fueron incubados por 1 hora en solución de albúmina de suero bovino (BSA 5%) para bloquear las uniones inespecíficas y a continuación sin realizar lavados, los cortes fueron incubados en el anticuerpo primario anti c-fos (Santa Cruz policlonal, producido en conejo en la concentración 1:1000) y mantenidos en agitación continua durante 15 horas. Después de 3 lavados de 5 minutos con PBS, fueron nuevamente incubados por una hora con el anticuerpo secundario biotinilado anti IgG en una concentración de 1:400 de PBS 0.1 M, pasado el tiempo de incubación

los cortes fueron lavados nuevamente con PBS 0.01 M en tres ocasiones y posteriormente incubados por una hora a temperatura ambiente en una solución ABC (Kit Vector, standart) y lavados tres ocasiones más con PBS, finalmente la reacción es revelada al utilizar 3,3'-diaminobenzidina (DAB) que al oxidarse forma un producto marrón insoluble, esto se realizó a temperatura ambiente durante 3-5 minutos. Para interrumpir la reacción los cortes fueron lavados nuevamente con PBS. Hasta el montaje en placas gelatinizadas las muestras fueron mantenidas en PBS.

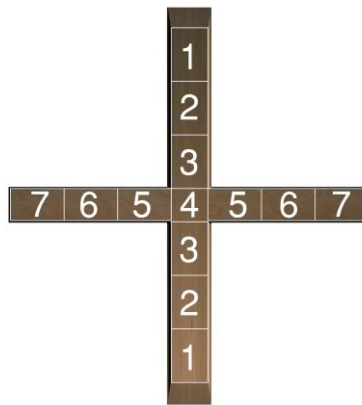
Zonas seleccionadas: Se estudiaron 26 zonas neuronales que fueron agrupadas de la siguiente manera: Corteza (PrL, IL, Cg1,Cg2, Pir1,M1y M2), Ganglios Basales (Cpu, GP, AcbC, AcbSh), Septum (SHi, MS, LSD, LSV), Tálamo (PVA), Hipotálamo (VMHC, DMC, MPOM), Amígdala (CeM, Cec, BLA, StMP), Hipocampo (CA1, CA2, CA3), Sustancia gris periacueductal (DMPAG).

*Lectura de las zonas seleccionadas:* Las placas fueron fotografiadas con ayuda de un microscopio (NIKON Eclipse E100) equipado con una cámara digital (Canon). Los núcleos de las neuronas que reaccionaron al DAB fueron contados automáticamente con el software de análisis de imágenes Image J, el cual se configuró con los filtros que permitieron retirar de cada una de las imágenes los valores atípicos. El conteo de células positivas para Fos se realizó con el objetivo 40 X. Todas las regiones fueron contadas bilateralmente y su nomenclatura se basó en el atlas de Paxinos y Watson (2007).

Se registraron las variables espacio temporales de: Porcentaje de Entradas a los Brazos abiertos (%EBA), Tiempo en los Brazos abiertos (TBA), Entradas al extremo del Brazo Abierto, Tiempo en el extremo del Brazo Abierto, Frecuencias de Valoración del Riesgo, Tiempo de Valoración del Riesgo, Entradas a los Brazos Cerrados (EBC). Tradicionalmente los comportamientos de valoración de riesgo han sido registrados a partir de los estiramientos que hace la rata, lo que se ha interpretado como una estrategia del animal para obtener información de las zonas

potencialmente peligrosas mientras se mantiene en las zonas cerradas del laberinto, a fin de generar una medida objetiva de este tipo de comportamiento, se evaluó la valoración de riesgo como el número de veces y el tiempo que le toma al animal hacer la transición entre la zona más expuesta del brazo cerrado (lugar 3) antes de ir al centro del laberinto (lugar 4)

Ilustración de las divisiones virtuales realizadas al LCE para el registro de las variables comportamentales.



**Experimento 2: Influencia de la iluminación ambiental y la aplicación de una benzodiazepina sobre la respuesta hormonal, evaluada por medio de los niveles de corticosterona en plasma de ratas expuestas por primera vez al LCE.**

Cuando el ambiente cambia, los organismos adoptan estrategias que involucran cambios en comportamiento y en la respuesta neuroendocrina y de esta manera enfrentan la experiencia estresante. Los mecanismos neuroendocrinos que controlan la respuesta al estrés generada por el contexto involucra el núcleo paraventricular del hipotálamo, en el que se encuentra un grupo de neuronas que secretan el factor de liberación de corticotropina (CRF), este es transportado a la hipófisis, donde estimula a las células productoras de la hormona

adrenocorticotrópica (ACTH) que a su vez estimula la corteza suprarrenal y como consecuencia se da la producción de glucocorticoides, entre ellos la corticosterona, que ejerce un efecto importante sobre el metabolismo de los hidratos de carbono.

### **Hipótesis**

La exploración aumentada de los BA del LCE cuando los animales son evaluados en niveles de iluminación baja se ha interpretado como evidencia de un menor nivel de ansiedad, de ser así, los ambientes poco iluminados deben representar una situación de menor estrés para el animal, por lo tanto, al utilizar los niveles de corticosterona en plasma como una medida indirecta del estrés generado por la situación ambiental deben reportarse los valores más bajos en los animales expuestos a ambientes no iluminados en comparación con aquellos expuestos a ambientes iluminados .

### **Materiales y Métodos**

Se replicó el Experimento 1 en la cantidad y distribución de los animales en los grupos experimentales, así como en la benzodiacepina utilizada y el tiempo de la prueba. Inmediatamente después de la exposición al laberinto o a la caja de acrílico, todos los animales fueron aislados en una caja 5 minutos antes de ser guillotinado, tiempo al cual se esperaba que los niveles de corticosterona alcanzaron su pico máximo. Se colectó sangre arterio-venosa por decapitación en tubos separadores de suero, a continuación se permitió la coagulación por 30 minutos después de los cuales la sangre fue centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos. El suero fue separado y congelado a -20 °C hasta el momento de la medición de la corticosterona con un kit comercial (Corticosterone rat/mouse ELISA MyBiosource)

*Determinación de los niveles de corticosterona por enzimoimmunoensayo ELISA*  
En cada uno de los 96 pozos de la placa se descargaron 10 µl de los 6

calibradores o de la muestra de suero. Inmediatamente después se agregó a cada pozo 100µl del búfer de incubación y 50 µl del conjugado anticuerpo/antígeno. Se incubó la placa durante 2 horas en agitación continua para luego descartar su contenido y aplicar 4 lavados, cada uno de ellos con 300µl de solución de lavado. A continuación se agregaron 200µl de la solución sustrato para dejar incubar por 30 minutos en oscuridad y sin agitación. Se agregaron 50µl de solución para detener la reacción y posteriormente se determinó la absorbancia de cada pozo a 450 nm y así obtener la concentración de corticosterona para cada individuo. Con los valores de absorbancia obtenidos para las concentraciones de los calibradores del kit, se realizó una curva de calibración que permitió conocer la concentración de corticosterona presente en cada pozo.

Dados los valores de absorbancia obtenidos para la calibración se realizó un **ajuste sobre la transformada lineal** de la siguiente ecuación:

$$Y=K1 \text{ EXP}(-C/K2)+LA.$$

Donde K1 y K2 son constantes, Y = absorbancia, C=concentración y LA= Límite asintótico.

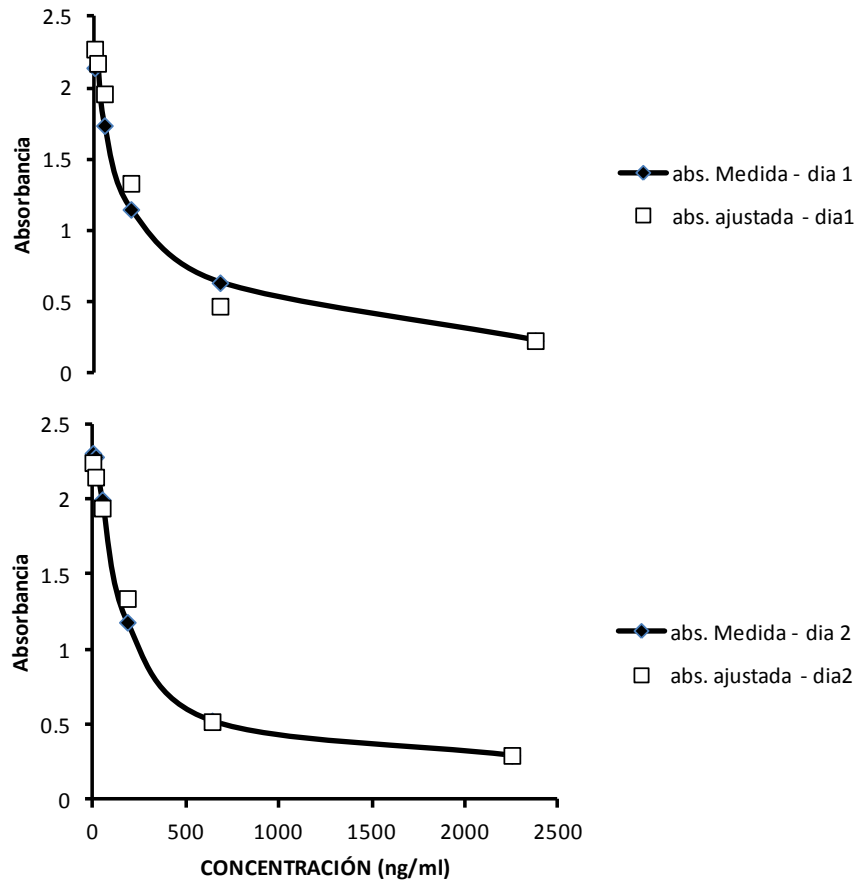
La transformada lineal utilizada:

$$\text{Ln}(Y-LA)=\text{ln}(K1)-(1/K2)*C.$$

Donde: K1= Intercepto del ajuste lineal 1/K2 = Es la pendiente del ajuste lineal. Para la obtención del límite asintótico se exploraron sistemáticamente 10 valores diferentes entre cero y el menor valor Y dejando como valor final el obtenido con el mejor ajuste.

Los resultados obtenidos se muestran en el Anexo 1.

### Gráficas de calibración con los datos medidos y sus ajustes



**Figura 1.** Curva de calibración utilizada para extrapolar desde el valor de absorbancia de las muestras, la concentración de corticosterona plasmática. Las gráficas corresponden a la calibración realizada para dos días diferentes en que se hicieron las lecturas.

### Análisis estadístico

Las variables espacio-temporales obtenidas desde el comportamiento exploratorio del LCE se presentan como promedio y error estándar. En todos los casos se muestran los datos en dos momentos del experimento, a los 5 minutos, tiempo

estándar en este tipo de evaluaciones y a los 15 minutos, tiempo total de evaluación en esta investigación. Los datos fueron analizados con un análisis de varianza (Anova) no paramétrica (Kruskal-Wallis) comparando los grupos establecidos en la Tabla 1. Cuando fue apropiado se realizó *post hoc* el test de comparaciones múltiples de Tukey. En todos los casos se tomó el valor de  $P < 0.05$  como nivel de significancia.

### Análisis de Sobrevida

El análisis de sobrevida de eventos repetidos es frecuentemente utilizado en las investigaciones biomédicas, y aunque fue propuesto inicialmente en salud (Greenwood y Yule, 1920) ha sido más utilizado en los estudios de “reliability” en ingeniería. En este tipo de análisis los datos surgen al evaluar el tiempo hasta la ocurrencia de uno o más eventos en el mismo sujeto. La manera más simple de análisis se hace el examinar únicamente el primer evento, ignorando los eventos posteriores, sin embargo de esta forma puede perderse información relevante (Cleves, 1999). Por esta razón se han desarrollado métodos alternativos que hacen uso de todos los datos disponibles. Uno de los enfoques para modelar este tipo de datos es el propuesto por Prentice, Williams y Peterson (1981), conocido como modelo de riesgo condicional y que tiene como característica la posibilidad de analizar los datos desde el inicio del experimento o desde el evento previo. En este tipo de estudios, la selección del modelo que más se ajusta a los datos se hace con base en el criterio de información bayesiana, BIC.

El tiempo de sobrevida se puede medir por varias funciones equivalentes, las más habituales son la función de sobrevida y la función de riesgo (Letón y Zuluaga, 2006). La función de sobrevida se enfoca en el tiempo en el que no se ha observado el evento de interés, mientras que la función de riesgo se enfoca en la posibilidad instantánea de que ocurra el evento (Kleinbaum y Klein, 2005).

La aplicación del análisis de sobrevida de eventos repetidos al utilizar la variable comportamental de entradas a los brazos abiertos, consideró cada una de las

ocasiones en que los animales hicieron entradas a los brazos abiertos del LCE, desde el inicio del experimento, estos datos fueron reportados como la Razón de riesgo instantáneo (Hazard ratio) de entradas a los brazos abiertos del laberinto.

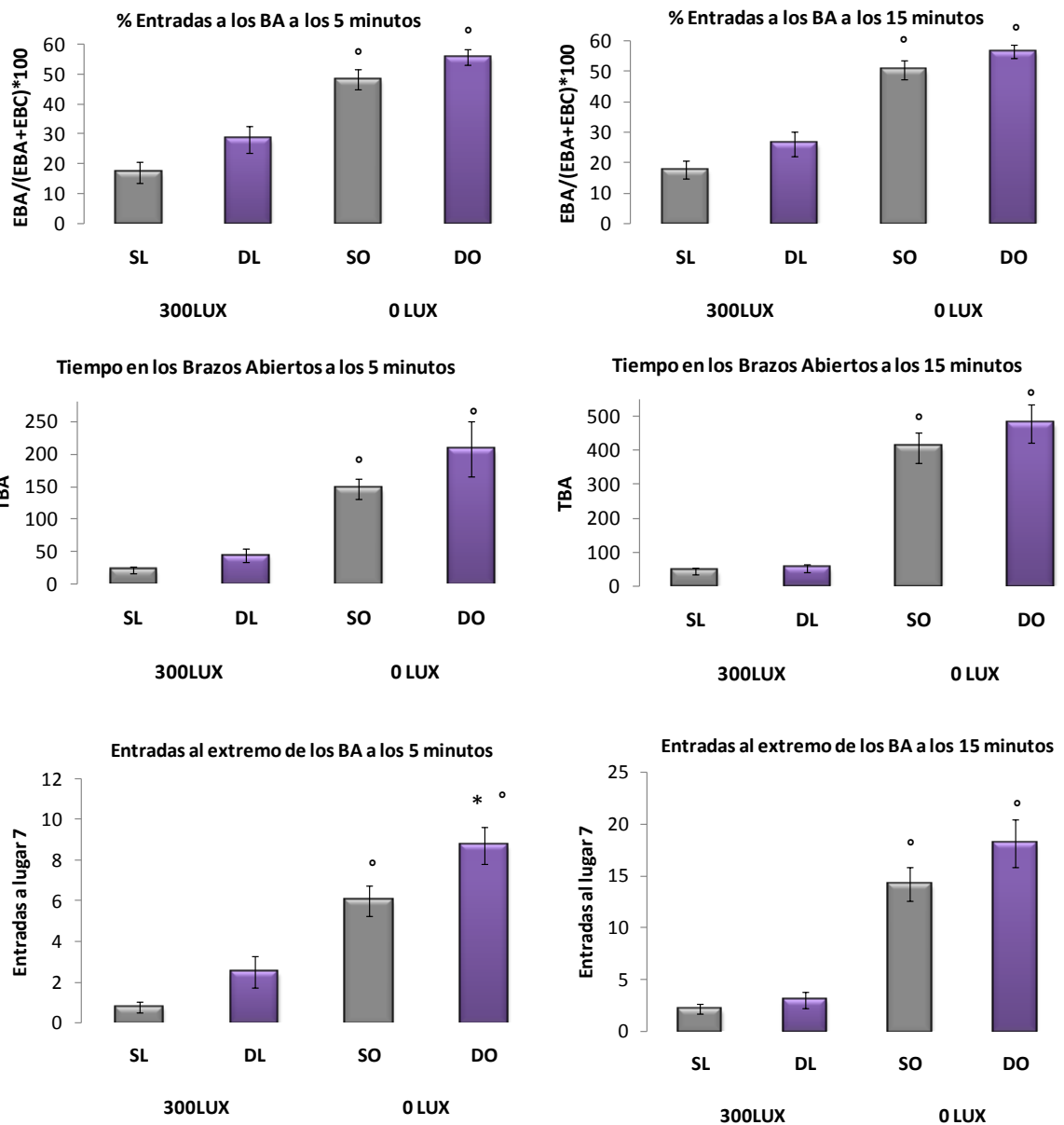
Los datos que corresponden a la expresión de la proteína Fos y al nivel de corticosterona en plasma, fueron analizados mediante regresión lineal múltiple. Ya que estos datos no presentaron una distribución normal, se acudió a la transformación de las variables de salida, conteo de núcleos positivos para Fos y concentración plasmática de corticosterona, para así simetrizar su distribución, que es uno de los requisitos de la regresión lineal. Se realizó entonces una transformación logarítmica. Para la interpretación de los coeficientes estimados estos fueron exponenciados, que es la función inversa al logaritmo. Los datos reportados corresponden a la razón o relación entre los dos valores de cada una de las variables predictoras estudiadas.

## Resultados

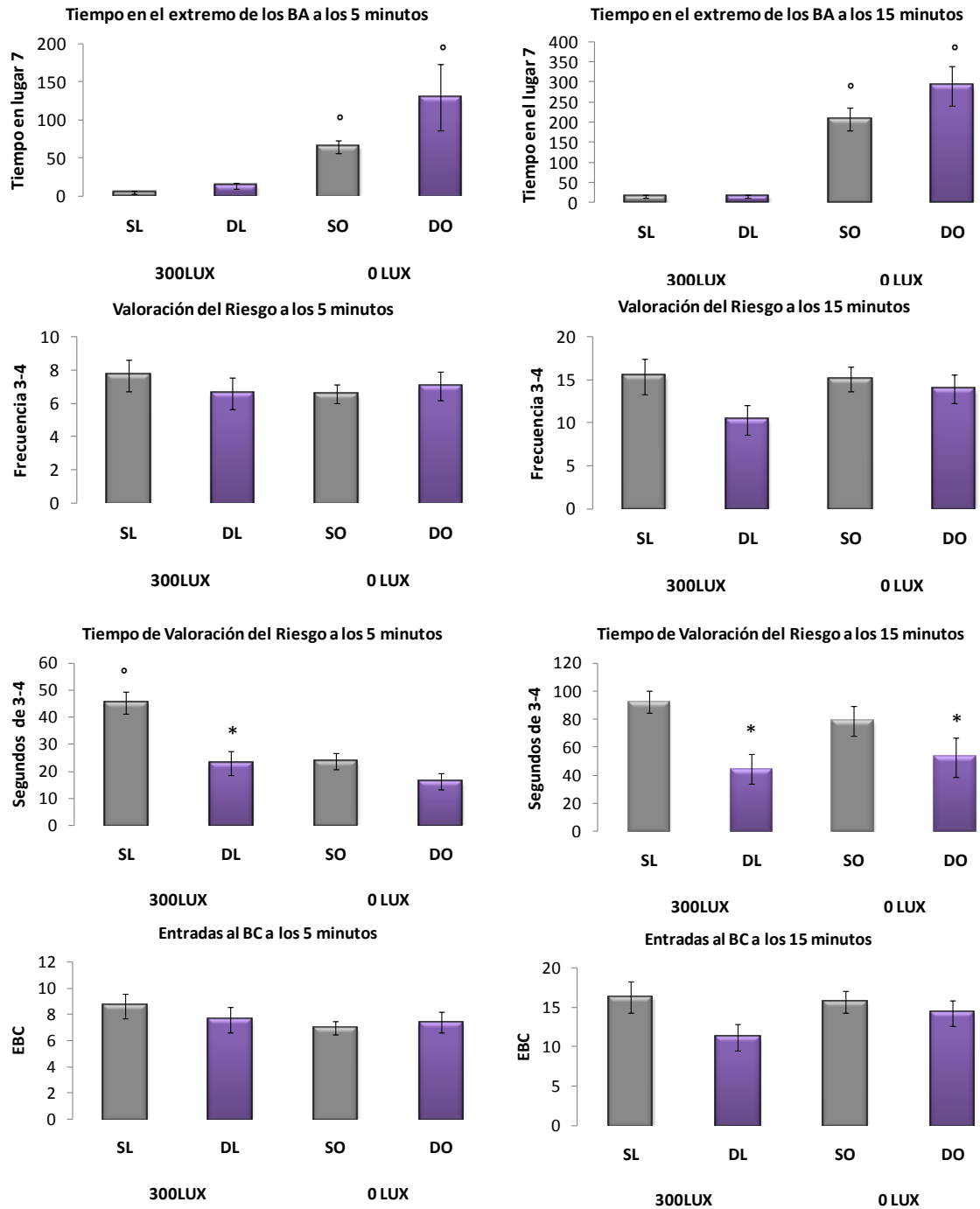
### Experimento 1

Los resultados obtenidos se muestran en el Anexo 2, en la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis de varianza que fue aplicado a las principales variables espacio temporales utilizadas como índices de ansiedad. Principalmente el Anova mostró que para el tiempo de valoración del riesgo, a los 15 minutos de experimento, hay diferencias atribuibles a la aplicación de la benzodiacepina tanto en luz como en oscuridad.

La Figura 2 presenta de manera gráfica el porcentaje de entradas a los brazos abiertos del laberinto, así como el tiempo en los brazos abiertos y las entradas al extremo de los brazos abiertos a los 5 y 15 minutos de experimento, la prueba estadística mostró que para estas tres variables se presentó actividad significativamente mayor cuando los animales fueron evaluados en oscuridad, independiente del tratamiento farmacológico. Estos resultados evidencian mayor actividad de exploración de las zonas potencialmente peligrosas del laberinto en aquellos animales evaluados en oscuridad, resultado que ha sido evidenciado previamente en otras investigaciones. La Figura 3 muestra el tiempo en el extremo del BA así como la frecuencia y tiempo del comportamiento designado como valoración del riesgo, se muestra igualmente las entradas a los brazos cerrados. La prueba estadística nuevamente mostró que presentan mayor tiempo en los extremos de los BA, los animales expuestos al laberinto sin iluminación ambiental, independiente del tratamiento farmacológico utilizado. Se evidencia igualmente el efecto ansiolítico del diazepam en oscuridad, al lograr disminuir el tiempo de que le toma a los animales hacer la transición del lugar 3 al 4 del LCE.



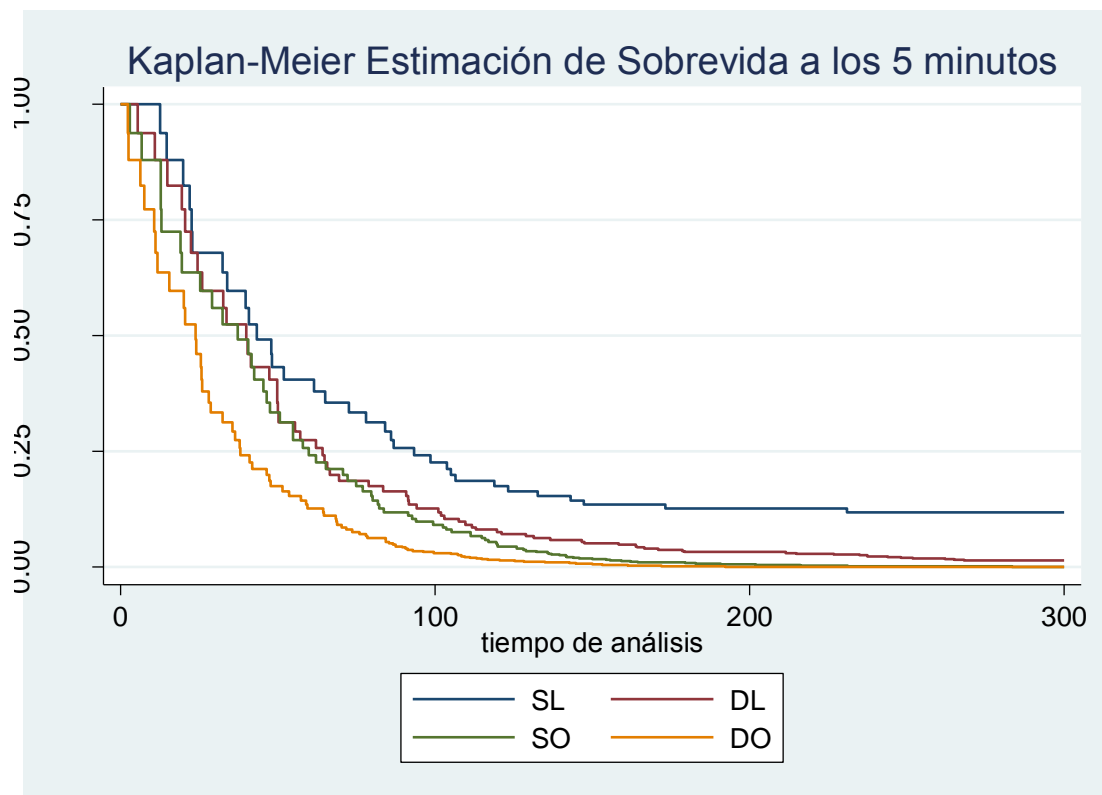
**Figura 2.** Porcentaje de entradas a los brazos abiertos, tiempo en los brazos abiertos y entradas al extremo de los brazos abiertos. Las barras representan los promedios y las líneas verticales representan la desviación estándar. \* Significativamente diferente del grupo bajo la misma iluminación pero con tratamiento farmacológico diferente; ° significativamente diferente del grupo con el mismo tratamiento farmacológico en diferente iluminación. P < 0,05).



**Figura 3.** Tiempo en el extremo de los brazos abiertos, frecuencia de valoración del riesgo, tiempo de valoración del riesgo y entradas a los brazos cerrados. Las barras representan los promedios y las líneas verticales representan la desviación estándar. \* Significativamente diferente del grupo bajo la misma iluminación pero con tratamiento farmacológico diferente; ° significativamente diferente del grupo con el mismo tratamiento farmacológico en diferente iluminación,  $P < 0,05$ ).

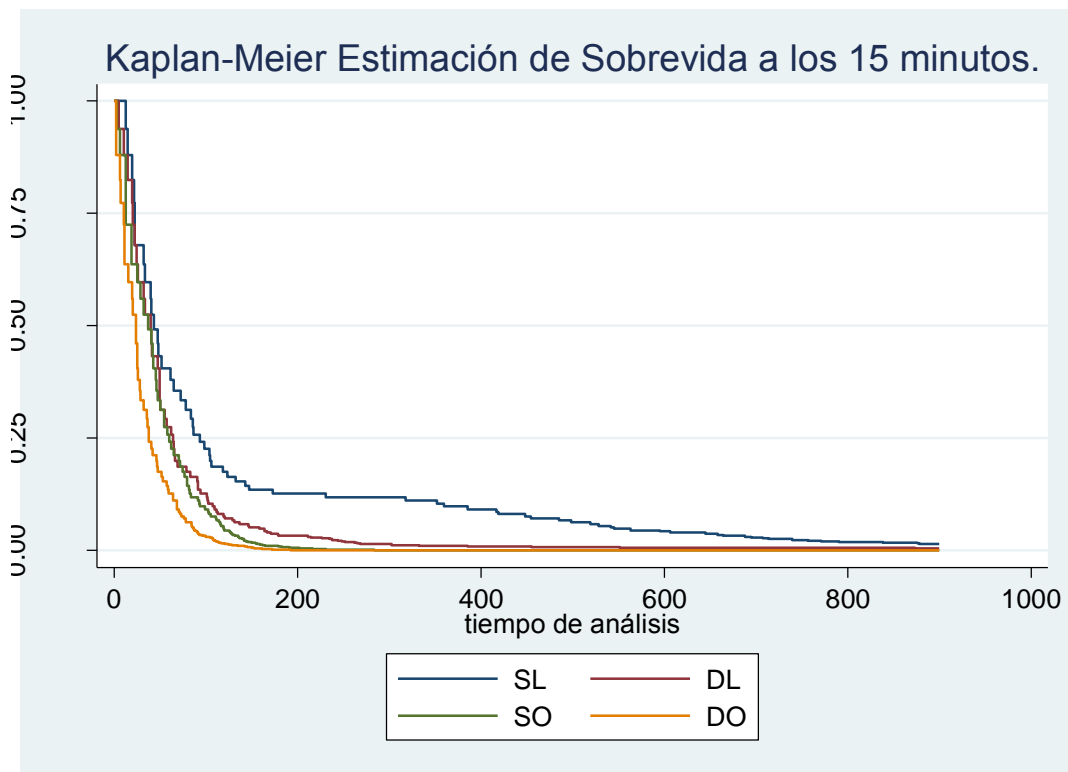
En este tipo de estudios donde se evalúa el comportamiento de los animales al exponerlos al LCE es importante demostrar que la actividad locomotora no está afectada en ninguno de los grupos y que la interpretación del patrón de exploración de las otras medidas espacio temporales evaluadas corresponden a la influencia generada por las variables que se están estudiando. La Figura 3 muestra que las entradas a los brazos cerrados del laberinto, una medida de la actividad locomotora, no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados, a los 5 y 15 minutos de exposición.

De manera general, el análisis de sobrevida es un método estadístico donde la variable de salida es el tiempo hasta que el evento de interés ocurre, por evento en este caso se hace referencia a las entradas a los brazos abiertos del laberinto.



**Figura 4.** Curvas Kaplan-Meier Estimación de Sobrevida a los 5 minutos de experimento a partir de las entradas a los brazos abiertos del laberinto.

Las Figuras 4y 5 muestran de manera ordenada cada unos de los eventos o “fallos” realizados por los animales para los grupos evaluados. Donde puede observarse que en las dos exploraciones, 5 y 15 minutos, los primeros en realizar entradas a los brazos abiertos son los animales que corresponden al grupo que fue evaluado en oscuridad extrema bajo el efecto del diazepam. Las curvas de Kaplan-Meier también evidencian que la curva para el grupo que fue expuesto al laberinto en iluminación alta después de la aplicación de la solución salina, muestra mayor tiempo para hacer las entradas al brazo abierto, desde el inicio de experimento.



**Figura 5.** Curvas Kaplan-Meier Estimación de Sobrevida a los 15 minutos de experimento a partir de las entradas a los brazos abiertos del laberinto.

El análisis de riesgo instantáneo además de ser la función contraria al tiempo de sobrevida, corresponde a una exploración de mayor sensibilidad para este tipo de eventos de entradas a los brazos abiertos, ya que tiene en cuenta tanto el evento,

la entrada, así como el tiempo en el que ocurre, además del peso que tienen las entradas iniciales sobre los eventos posteriores.

**Tabla 2.** Resultado estadístico del análisis de Razones de Riesgo instantáneo de las entradas al brazo abierto del laberinto, a los 5 minutos de experimento.

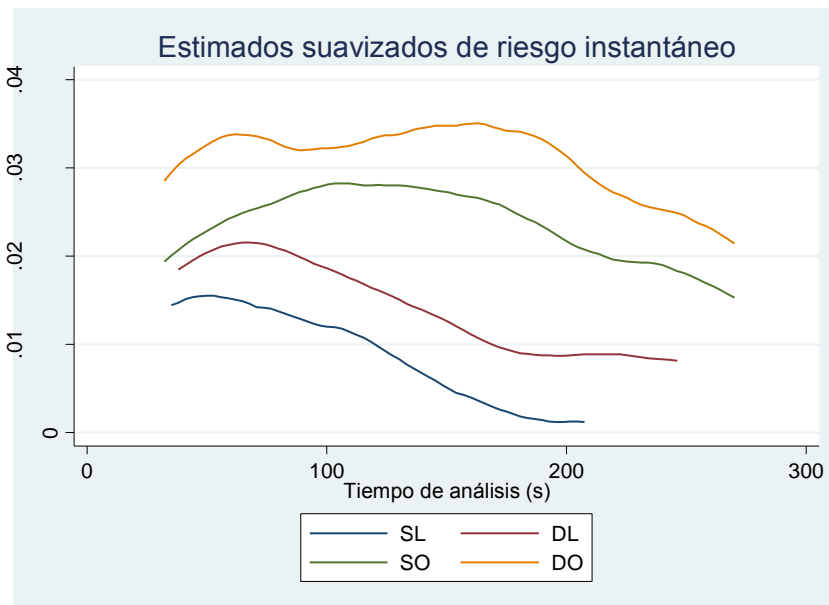
Grupo	Riesgo	95% IC		P
<b>SL</b>	1	Grupo base de comparación		
<b>DL</b>	1.77	1.19	2.63	<b>0.01</b>
<b>SO</b>	2.35	1.70	3.24	<b>&lt;0.001</b>
<b>DO</b>	3.09	2.18	4.39	<b>&lt;0.001</b>

Las Tablas 2 y 3 muestran el análisis estadístico de las razones de riesgo instantáneo, para las entradas al brazo abierto del laberinto a los 5 y 15 minutos de experimento, respectivamente. El grupo que se tomó como base para hacer las comparaciones, fue el formado por los animales que se expusieron al laberinto en iluminación alta después de la aplicación de solución salina, ya que esta situación corresponde a la más ansiogénica, según lo reportado ampliamente en todas las investigaciones donde se hace uso del LCE. A este grupo se le asignó una razón de riesgo instantáneo de entradas a los brazos abiertos de 1. Bajo el mismo nivel de iluminación, pero con la aplicación del diazepam la razón de riesgo instantáneo de entradas a los brazos abiertos subió a 1.77 con un valor de  $P=0.01$ . Lo que evidencia por una parte, el efecto ansiolítico del diazepam, ya que bajo su efecto farmacológico los animales aumentaron el riesgo instantáneo de entradas al brazo abierto y por otra parte evidencia la sensibilidad de este tipo de análisis realizado con solo 8 animales por grupo evaluado. De igual forma, se demuestra que evaluar el comportamiento de los animales en oscuridad aumenta el riesgo de EBA, ya que al exponerlos al laberinto en oscuridad extrema después de la aplicación de solución salina, lleva el riesgo instantáneo de hacer entradas al brazo abierto de 1 a 2.35, con un valor de  $P\leq 0.01$  y al exponerlos en oscuridad extrema bajo el efecto de la benzodiazepina, lleva el valor del riesgo instantáneo

hasta 3.09 con un valor de  $P \leq 0.01$ , todo esto a los 5 minutos de exposición al LCE. Lo que demuestra además el efecto ansiolítico de la benzodiacepina, aún en oscuridad. Al analizar los 15 minutos de exposición, se obtiene que la razón de riesgo instantáneo de entradas a los brazos abiertos no es diferente entre los grupos evaluados en iluminación alta con benzodiacepina y solución vehículo, pero si se mantiene la diferencia entre los animales evaluados con solución salina en luz y oscuridad, con un valor de  $P \leq 0.01$  y con los animales evaluados en oscuridad después de la aplicación del diazepam,  $P \leq 0.01$ .

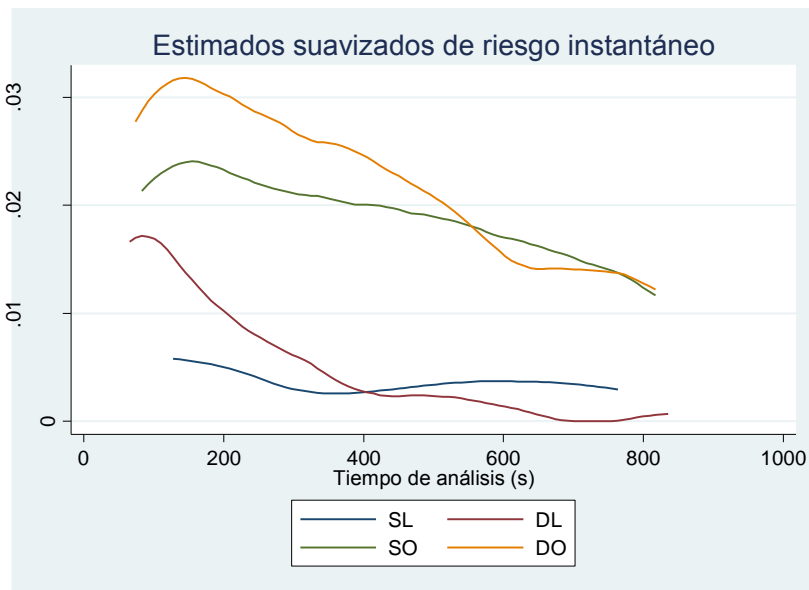
**Tabla 3.** Resultado estadístico del análisis de Razones de Riesgo instantáneo de las entradas al brazo abierto del laberinto, a los 15 minutos de experimento.

Grupo	Riesgo	95% IC		P
<b>SL</b>	<b>1</b>	Grupo base de comparación		
<b>DL</b>	1.03	0.75	1.41	0.85
<b>SO</b>	1.90	1.48	2.43	<b>&lt;0.001</b>
<b>DO</b>	2.12	1.58	2.86	<b>&lt;0.001</b>



**Figura 6.** Estimados suavizados de riesgo instantáneo de las entradas a los brazos abiertos del laberinto, a los 5 minutos de experimento.

En la Figura 6 se grafica el riesgo instantáneo de entradas al brazo abierto a los 5 minutos de experimento para los 4 grupos evaluados, donde se evidencia que sumados, el diazepam y el nivel de iluminación generan diferentes patrones de exploración, específicamente puede observarse un mayor riesgo de hacer entradas al brazo abierto en los animales evaluados en oscuridad. La exploración del LCE durante 15 minutos permite observar inicialmente el mismo grado de riesgo de entradas al brazo abierto observado a los 5 minutos, pero particularmente muestra que cuando se da el tiempo necesario, se observa una disminución del riesgo instantáneo de entradas al brazo abierto aunque los animales estén bajo el efecto de la benzodiacepina, este grupo de animales de hecho llega a tener un menor riesgo de entradas que los animales a los que se les aplicó la solución salina, disminución que se evidencia tanto en luz como en oscuridad, solo que en oscuridad esta disminución ocurre aproximadamente 200 segundos después de lo que ocurre cuando se evalúa a los animales en luz, como puede observarse en la Figura 7.



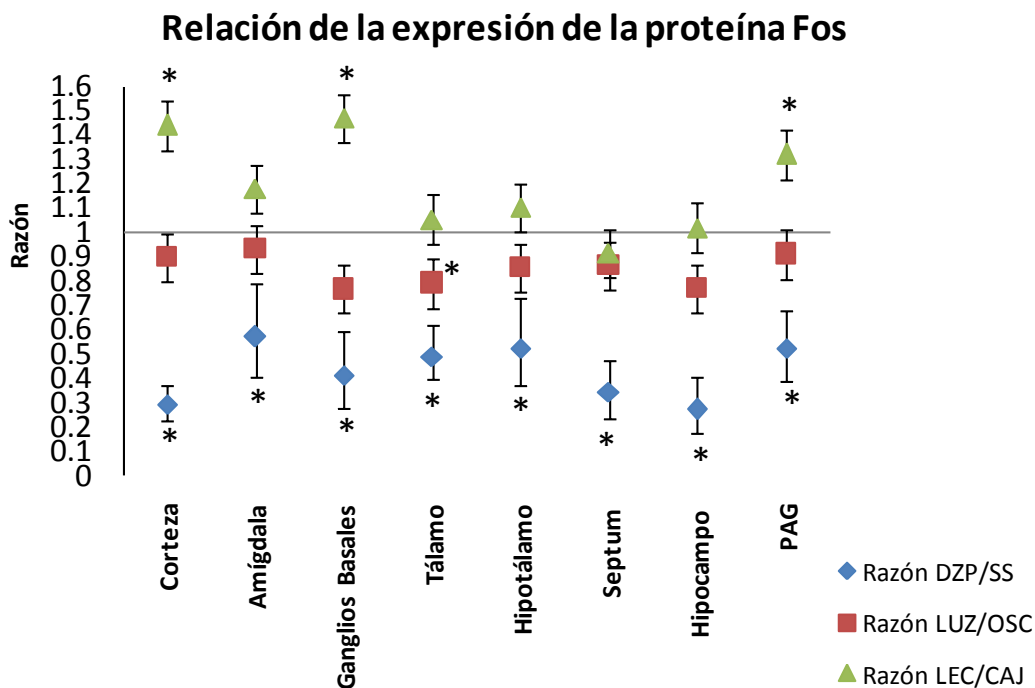
**Figura 7.** Riesgo instantáneo de las entradas a los brazos abiertos del laberinto, a los 15 minutos de experimento.

Se implementó el método de regresión lineal múltiple, designando como variable de salida el número de núcleos marcados positivos para Fos en las diferentes áreas estudiadas y como variables predictoras: el nivel de iluminación, LUZ= expuestos a iluminación de 300 lux; OSC= expuestos a iluminación de 0 lux, el tratamiento farmacológico utilizado, DZP= evaluados después de la aplicación del diazepam; SS= evaluados después de la aplicación de solución salina y finalmente el lugar al que fueron expuestos, LCE= expuestos al laberinto en cruz elevado; CAJA= expuestos a la caja de acrílico. Donde OSC, SS y CAJA corresponden a un valor de 0. Los resultados derivados de dicho análisis están consignados en la Tabla 4. Ya que se trabajó con el logaritmo natural del número de neuronas activas para cada una de las estructuras, al realizar la transformación de los coeficientes obtenemos el valor de razón, valores que son graficados en la Figura 8 con lo cual tenemos la proporción de cambio en la que una u otra variable afecta el número de neuronas que participan. Principalmente se observa que la aplicación del diazepam genera una disminución del número de núcleos activos en todas las estructuras evaluadas, específicamente se encuentra una disminución del 71% en corteza, 43 % en amígdala, 59% en ganglios basales, 51% en tálamo, 48% en hipotálamo, 66% en septum, 73% en hipocampo y 48% en sustancia gris periacueductal. Por otra parte exponer a los animales en un ambiente iluminado genera una disminución respecto a oscuridad, del número de neuronas marcadas como positivas para la proteína Fos en tálamo, dicha disminución corresponde a un 21% y es la única estructura que se ve afectada de manera significativa por la presencia de luz, es de notar que en las demás estructuras hay una tendencia de disminución. La exposición de los animales al LCE genera un aumento significativo del número de núcleos activos para corteza en un 44%, en ganglios basales del 47% y en sustancia gris periacueductal del 32% y una tendencia de

aumento en amígdala, tálamo e hipotálamo. Las imágenes de las estructuras evaluadas están consignadas en el Anexo 3.

**Tabla 4.** Resultados regresión lineal múltiple del número de neuronas marcadas para Fos (promedio de células/0.1 mm<sup>2</sup>) y la influencia de las variables estudiadas.

Estructuras	R2 Ajustado	Intercepto	P	LUZ-OSC	P	DZP-SS	P	LCE-CAJA	P
Ln Corteza	0.6633	5.22971	<0.001	-0.1105	0.37	-1.2342	<0.001	0.366318	0.004
Ln Amígdala	0.15	3.098823	<0.001	-0.0713	0.68	-0.5696	0.001	0.166336	0.331
Ln G. Basales	0.3147	3.430891	<0.001	-0.2665	0.17	-0.9036	<0.001	0.386455	0.049
Ln Tálamo	0.3928	4.061476	<0.001	-0.2361	0.04	-0.7036	<0.001	0.052916	0.646
Ln Hipotálamo	0.1953	3.636701	<0.001	-0.1593	0.34	-0.6516	<0.001	0.095638	0.567
Ln Septum	0.4097	4.113122	<0.001	-0.1473	0.39	-1.0935	<0.001	-0.09009	0.646
Ln Hipocampo	0.4099	2.266954	<0.001	-0.2607	0.23	-1.3266	<0.001	0.019945	0.926
Ln PAG	0.3101	2.956802	<0.001	-0.0946	0.5	-0.6607	<0.001	0.276087	0.04



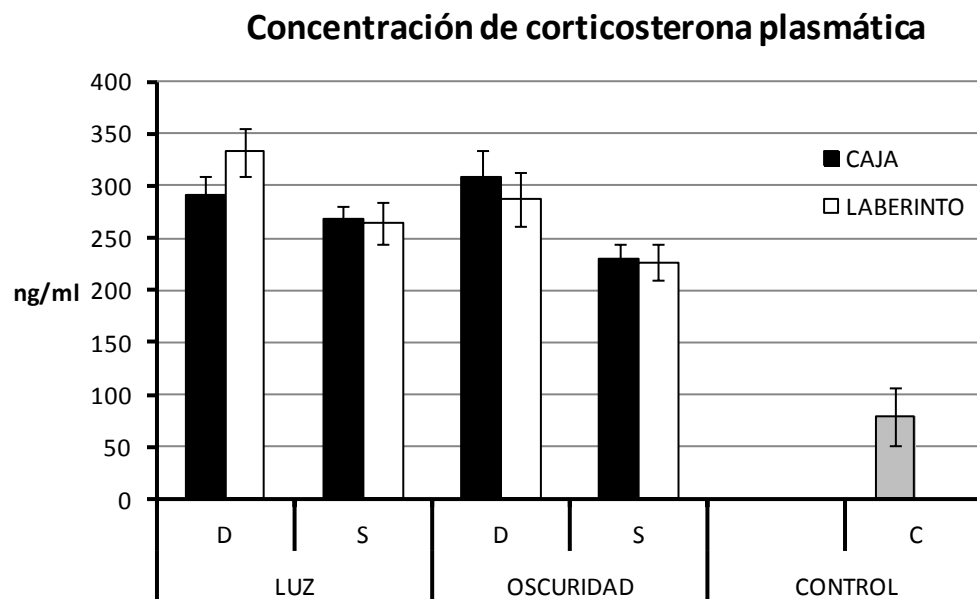
**Figura 8.** Razón de las neuronas marcadas para Fos (promedio de células /0.1 mm<sup>2</sup>) en cada una de las variables evaluadas. (LUZ= expuestos a iluminación de

300 lux; OSC= expuestos a iluminación de 0 lux; DZP= evaluados después de la aplicación del diazepam; SS= evaluados después de la aplicación de solución salina; LCE= expuestos al laberinto en cruz elevado; CAJA= expuestos a la caja de acrílico) \* Relación significativa P<0.05.

## Experimento 2

**Tabla 5.** Resultados regresión lineal múltiple de la concentración de corticosterona en plasma y la influencia de las variables estudiadas.

R cuadrado	R2 Ajustado	Intercepto	P	LUZ-OSC	P	DZP-SS	P	LCE-CAJ	P
0.2205	0.1815	4.892188	<0.001	0.231263	0.06	0.4400537	<b>0.001</b>	0.002194	0.986

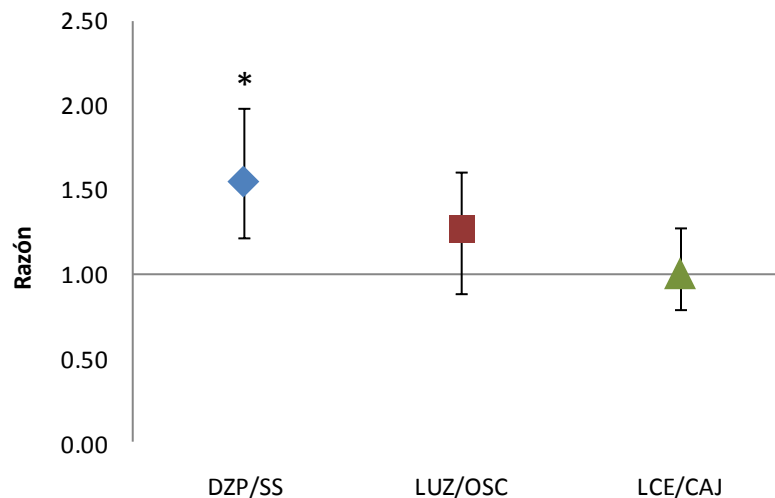


**Figura 9.** Concentración de corticosterona plasmática en cada uno de los grupos.

**Tabla 6.** Valores de concentración plasmática de corticosterona.

Promedios de la concentración de corticosterona plasmática					
LUGAR	LUZ		OSCURIDAD		Control
	Diazepan	Salina	Diazepan	Salina	
CAJA	291.77	267.57	309.38	230.76	78.91
LABERINTO	332.32	264.70	287.42	226.90	
Errores estándar de la concentración de corticosterona plasmática					
	LUZ		OSCURIDAD		Control
	Diazepan	Salina	Diazepan	Salina	
EE-CAJA	16.72	13.88	25.46	13.93	27.23
EE-LABERINTO	23.05	19.97	25.49	17.00	

**Relación de los niveles de corticosterona en plasma**



**Figura 10.** Razón del nivel de corticosterona en sangre en cada una de las variables evaluadas. (LUZ= expuestos a iluminación de 300 lux; OSC= expuestos a iluminación de 0 lux; DZP= evaluados después de la aplicación del diazepam; SS= evaluados después de la aplicación de solución salina; LCE= expuestos al laberinto en cruz elevado; CAJA= expuestos a la caja de acrílico) \* Relación significativa  $P < 0.05$ .

Como indicador objetivo de estrés se evaluó el nivel de corticosterona en plasma generado por la iluminación, el tratamiento farmacológico o el lugar donde fueron expuestos los animales, la Tabla 5 muestra los resultados obtenidos para la regresión lineal aplicada a los datos. La Figura 9 y la Tabla 6 muestran los valores de concentración plasmática, mientras que la Figura 10 muestra la proporción de cambio, en este caso aquellos animales que fueron evaluados bajo el efecto del dizepam alcanzaron un mayor nivel de corticosterona en plasma en una proporción de 55%.

## Discusión

Los comportamientos defensivos como estrategias de protección frente a posibles estímulos o situaciones que pueden dañar el organismo se han venido utilizando en un intento de discernir el componente biológico subyacente a los comportamientos asociados con ansiedad, respuestas no condicionadas que son evaluadas en el animal a través del patrón exploratorio en modelos como el LCE. Ciertos estímulos son interpretados como ansiolíticos cuando promueven la exploración de las zonas potencialmente peligrosas del LCE, los BA, y por el contrario, son interpretados como ansiogénicos cuando disminuyen su exploración. La principal pregunta que se aborda en esta investigación, es determinar si el patrón de exploración observado cuando los animales se evalúan sin iluminación corresponde a una situación ansiolítica, es decir si la ausencia de luz en si misma evita la generación de comportamientos defensivos asociados con ansiedad y a su vez explora si la benzodiacepina utilizada no ejerce su efecto farmacológico cuando los animales son evaluados en total oscuridad como lo proponen García *et al.* (2011)

Los datos de comportamiento previamente expuestos, muestran de manera contundente que la iluminación ambiental durante la exposición al laberinto influencia dicho patrón de exploración de las zonas abiertas, ya que en ausencia

de iluminación se observa un mayor número de entradas y tiempo de permanencia en los BA (frecuencia de entrada a los BA y tiempo de permanencia en los BA así como la frecuencia y el tiempo de permanencia en los extremos de estos brazos, estimados suavizados de riesgo instantáneo de EBA a los 5 y 15 minutos). Al encontrar que la exploración de los brazos cerrados no disminuye con el tiempo y además que no muestra diferencias entre los grupos evaluados (entradas a los BC a los 5 y 15 minutos), evidencia que la actividad locomotora de los animales no está siendo afectada por ninguna de las variables estudiadas,

El primer nivel de defensa según lo exponen Blanchard y Blanchard (1988) corresponde a aquellos comportamientos que le permiten al animal adquirir y renovar la información sobre el ambiente en el que se encuentra, este tipo de comportamientos han sido de gran utilidad ya que muestran que el animal puede obtener información de las zonas abiertas de manera cautelosa, sin necesidad de una exposición total y de esta forma optimizan su respuesta, ya sea de evitación o de exposición. La frecuencia con la que se realiza la transición entre la zona más expuesta del brazo cerrado (lugar 3) hacia la zona central del laberinto (lugar 4) está asociada a la actividad locomotora, razón por la cual en esta variable espacio temporal no se encuentran diferencias entre los grupos, mientras que el tiempo que le toma al animal hacer la transición muestra que este tipo de comportamientos de valoración del riesgo están disminuidos en los animales que fueron tratados con la benzodiacepina, evidencia de su efecto ansiolítico (tiempo de valoración del riesgo a los 5 minutos), al exponer los animales en oscuridad con un mayor tiempo de exploración, dicho efecto ansiolítico también es encontrado (tiempo de valoración del riesgo a los 15 minutos). Otro resultado que refleja el efecto ansiolítico de la benzodiacepina en oscuridad, es la frecuencia con la que el animal se expone al extremo del BA (entradas al extremo de los BA a los 5 minutos). Con algunas de las variables espacio temporales no es evidente el efecto del fármaco ya que no es posible encontrar diferencias con el grupo control,

se cree que este efecto de aumento en la exploración de los BA del laberinto en oscuridad, por ser semejante al efecto que se ha encontrado con el uso de fármacos ansiolíticos, puede ser entendido como una inhibición de mecanismos que normalmente inducen respuestas asociadas con ansiedad, tomadas de las variables espacio temporales observadas, donde la oscuridad podría estar disminuyendo la aversión generada por los BA, por esta razón se necesitó el registro de índices fisiológicos que expresaran los cambios generados por la exposición al laberinto y la posible influencia sobre dichos registros dada por la iluminación.

La expresión de la proteína Fos como indicador de lo que le sucede al roedor muestra en primer lugar y de manera convincente el efecto esperado cuando se aplica una benzodiazepina, esta reducción general y significativa de la activación neuronal en las estructuras del sistema límbico estudiadas evidencia el efecto farmacológico de disminución en la probabilidad de su excitación, lo que comprueba la facilitación de la actividad GABAérgica dada por el diazepam, en estas estructuras, aunque los valores de inhibición sean bajos (Resultados de la regresión lineal múltiple del número de neuronas marcadas para Fos).

Los resultados de la activación neuronal influenciada por el nivel de iluminación muestran una tendencia de menor expresión cuando los animales fueron evaluados en iluminación alta, pero de manera general se observa que no hay diferencias significativas en la expresión de la proteína Fos al evaluar los animales en luz u oscuridad, salvo en tálamo. Resultados similares se encuentran en la investigación desarrollada por Bouwknecht *et al.* (2007) donde expusieron ratas Wistar macho a un campo abierto durante 15 minutos, esta exposición se realizó en condiciones de iluminación alta (400-500 lux) o baja (8-13 lux) y posteriormente se evaluó el número de neuronas positivas para la proteína Fos a nivel del núcleo del rafe dorsal. Los resultados mostraron un menor índice de locomoción en los animales expuestos al campo abierto en iluminación alta y un mayor porcentaje de tiempo en las esquinas para este mismo grupo, reportaron de igual manera, que

aunque hubo diferencias significativas entre los dos grupos en la actividad observada en el centro del campo abierto, esta actividad fue más baja de lo esperado para el grupo expuesto en oscuridad (menos del 5%), mientras que el registro de comportamientos relacionados con valoración de riesgo fue similar en los dos grupos. Con relación a los resultados de activación neuronal, no encontraron diferencias atribuibles a la iluminación ambiental en la que fueron evaluados los animales. En un experimento similar realizado por el mismo grupo (Hale *et al.*, 2006) pero donde se evaluó el número de neuronas positivas para la proteína Fos a nivel de los diferentes núcleos de amígdala, de nuevo no se encontraron diferencias en la expresión, atribuibles al nivel de iluminación, excepto en el núcleo basolateral de la amígdala y en la subdivisión posterior del núcleo basomedial, zonas en las que se encontró mayor expresión en los animales expuestos al campo abierto en iluminación baja (8-13 lux), motivo por el cual concluyen que el estímulo ambiental de oscuridad puede ser interpretado como un estímulo aversivo leve (Hale *et al.*, 2008) . El registro del comportamiento en estos experimentos muestran un alto nivel de locomoción en el campo abierto para los animales evaluados en oscuridad, pero las variables que indagan su nivel de ansiedad fallan en encontrar diferencias entre los dos grupos, ya que no presentan una exploración alta de las zonas centrales y muestran el mismo nivel de valoración de riesgo que los animales evaluados con iluminación alta, resultados similares a los encontrados en esta investigación para los animales control (tiempo de valoración del riesgo a los 15 minutos).

¿La ausencia de iluminación tiene un efecto ansiolítico o es un facilitador de la exploración?

Una segunda exposición al LCE se caracteriza por una disminución significativa de las entradas a los BA incluso si a los animales se les ha aplicado una benzodiazepina, fenómeno conocido como “One Trial Tolerance” (OTT). Para que este fenómeno se presente el animal debe haber explorado la totalidad del laberinto y haber contrastado las características de los BA y los BC (Bertoglio y

Carobrez, 2000), cuando el animal ha sido evaluado en oscuridad total en la primera y segunda experiencia, presenta de igual manera este fenómeno en el que la benzodiazepina pierde su efecto ansiolítico, lo que demuestra que el animal aunque sea evaluado en oscuridad adquiere la intensa aversión por los espacios abiertos, evidencia que apoya la hipótesis de que la mayor exploración realizada por los animales en este tipo de zonas puede estar relacionada con la ausencia de información visual, así que les toma más tiempo explorar y obtener información espacial relevante acerca del laberinto, especialmente de las zonas sin paredes, evidencia que no es congruente con la idea de que en oscuridad no se presentan los mecanismos defensivos que conducen a la aversión de las zonas abiertas (Costa, 2008). Lo que indican los datos obtenidos en esta investigación, es que la oscuridad puede estar retardando la adquisición de la aversión por los BA, reduciendo de esta manera los índices tomados de las variables espacio temporales que han sido relacionados con ansiedad. Permitir una exploración de 15 minutos facilita observar el desplazamiento de aproximadamente 200 segundos para que ocurra la disminución del comportamiento exploratorio de las zonas potencialmente peligrosas, en aquellos animales en que las EBA fueron facilitadas por el efecto ansiolítico del diazepam al evaluarlos en oscuridad (Riesgo instantáneo de las entradas a los brazos abiertos del laberinto, a los 15 minutos de experimento). No hallar diferencias en la activación de la proteína Fos en luz y oscuridad, apoya la hipótesis de que en los dos ambientes se están presentando mecanismos defensivos, ya que las estructuras evaluadas corresponden al circuito propuesto como responsable de este tipo de respuestas a potenciales amenazas. De manera llamativa el núcleo paraventricular del tálamo (PVA) es la única zona neuronal en la que se encuentra una diferencia significativa entre luz y oscuridad, siendo mayor la activación cuando los animales fueron evaluados en oscuridad. La influencia de la actividad en tálamo sobre el control de estados emocionales no ha recibido tanta atención como otras estructuras cerebrales, el núcleo paraventricular ha despertado interés ya que se proyecta a núcleo accumbens, al núcleo del lecho de la estría terminal y al núcleo central de la amígdala,

estructuras que se han agrupado en la llamada amígdala extendida (Alheid, 2003). Estudios que involucran la activación de la proteína Fos han reportado que las neuronas en este núcleo del tálamo están más activas durante períodos de excitación y en condiciones de aversión (Timofeeva y Richard, 2001). El núcleo paraventricular es innervado por proyecciones que se originan en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, principal estructura marcapaso involucrada en cambios fisiológicos y en el comportamiento, modulados por los ritmos circadianos, es así que los ritmos de actividad que se han observado en el núcleo paraventricular parecen estar relacionados con su influencia en estados de vigilia (Novak *et al.*, 2000). Ya que este núcleo está relacionado con la regulación de ritmos circadianos, los resultados que muestran una mayor activación de proteína Fos parecen ser congruentes con la información sensorial asociada a oscuridad y el ciclo de vigilia de este tipo de roedor nocturno, donde la ausencia de iluminación podría constituir un incentivo para la exploración.

Esta investigación involucró la exposición de los animales al LCE o a una caja de acrílico, a fin de explorar la influencia del espacio en el que fueron expuestos los animales sobre la expresión de la proteína Fos. De manera interesante se encontró que la exposición al LCE o a la caja de acrílico generó una activación similar en estructuras como amígdala, tálamo, hipotálamo, septum e hipocampo, debido quizá a la novedad generada por cualquiera de los dos ambientes. Esto muestra una alta reactividad por los estímulos novedosos, perfil que se ha asociado con la exhibición de un alto nivel de locomoción cuando a los animales se les da la posibilidad de explorar libremente ambientes desconocidos (Kabbaj y Akil, 2001). En los animales expuestos al LCE se observa un patrón de mayor activación de la proteína Fos que incluye estructuras agrupadas en corteza, ganglios basales y sustancia gris periacueductal. Una mayor actividad neuronal en corteza puede estar asociada a que además de contener las cortezas motoras primaria y secundaria, contiene a la corteza medial prefrontal, que agrupa la corteza prelímbica, infralímbica y cingulada, cuya lesión favorece la exploración de los BA del laberinto, por lo que se han involucrado con la aparición de

comportamientos relacionados con ansiedad, cada una de estas estructuras parecen ejercer una influencia sobre la motivación e inhibición de comportamientos (LeDoux, 2000). Proyecciones que descienden desde corteza a núcleo accumbens parecen ejercer un control regulatorio sobre comportamientos de búsqueda de recompensa, por lo que se ha hipotetizado como un intermediario entre el sistema límbico y el sistema motor, lo que es congruente con la evidencia de mayor actividad en las estructuras agrupadas en ganglios basales en los animales expuestos al LCE en relación con los expuestos a la caja de acrílico, ya que es en el laberinto donde se reportan comportamientos de aproximación o búsqueda y evitación. La sustancia gris periacueductal, es una estructura del cerebro medio que hace parte del sistema defensivo, específicamente es una estructura clave para organizar respuestas defensivas motoras. Micro infusiones de midazolam han evidenciado una disminución de comportamientos asociados a ansiedad, demostrando su papel modulador cuando los animales son expuestos por primera vez al LCE (Reis y Canto de Souza, 2008), la evidencia de mayor expresión de proteína Fos en esta estructura cuando los animales son evaluados en el laberinto en relación a los evaluados en la caja de acrílico así lo confirma.

Como segundo indicador fisiológico de la influencia de las variables estudiadas sobre el animal se usaron los niveles de corticosterona en plasma como una medida indirecta de estrés, representado como la interacción entre un tipo particular de estímulo ambiental y la respuesta específica de un sistema (activación del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal, HPA). La respuesta endocrina cuando los animales son expuestos tanto en el LCE como en la caja de acrílico no presenta diferencias, lo que puede indicar que los dos por ser ambientes novedosos generan una influencia similar sobre las estructuras que inician la cascada hormonal que conlleva a la secreción de corticosterona. Lo mismo ocurre con la iluminación, demostrando una vez más que una alta exploración de las zonas abiertas del LCE en oscuridad, no significa necesariamente que los animales no presenten respuestas asociadas a mecanismos defensivos.

Investigaciones previas han mostrado que el diazepam disminuye la actividad del eje HPA en contextos estresantes, pero paradójicamente también se ha reportado que la administración de benzodiazepinas estimula la actividad basal de este eje aunque en comportamiento se observe su efecto ansiolítico, al parecer este efecto es observado en dosis menores a 3 mg/Kg (Kalman, *et al.*, 1997), lo que podría explicar el mayor nivel de corticosterona en plasma que se observa en los animales a los que se les aplicó la benzodiazepina.

### **Conclusión**

Evaluar a los animales en oscuridad nos permite observar una mayor exploración de los BA del LCE, pero este patrón de exploración no pareciera congruente con una disminución en los niveles de ansiedad, lo que observamos es que la oscuridad parece retrasar la evitación por las zonas potencialmente peligrosas. En oscuridad la ausencia de pistas obtenidas por vía visual sobre el ambiente en que está siendo expuesto el animal, parece incitar el mayor tiempo en la recolecta de información y de esta manera la aversión generada por los BA ocurre primero en los animales evaluados con iluminación ambiental que en los evaluados en oscuridad total. La expresión de la proteína Fos demuestra la activación similar de las estructuras del sistema límbico independiente de la iluminación en que hayan sido expuestos, la única estructura que tiene un patrón de activación significativamente diferente es el núcleo paraventricular del tálamo, que muestra una mayor actividad cuando los animales fueron evaluados en oscuridad, ya que la actividad en este núcleo ha sido relacionada con la regulación de ritmos circadianos, parece ser congruente con la información sensorial asociada a oscuridad y el ciclo de vigilia de este tipo de roedor nocturno. De igual manera los niveles de corticosterona encontrados en plasma, apoyan la hipótesis de que los dos ambientes promueven la generación de mecanismos defensivos.

## Bibliografía

Albrechet-Souza L, Carvalho MC, Franci CR, Brandao ML. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. *Hormones and Behavior* 2007; 52: 267-273.

Alheid GF. Extended amygdala and basal forebrain. *Annals of the New York Academy Science* 2003;985:185–205.

Amaral DG, Witter MP. Hippocampal formation. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. Second Edition. London: Academic Press; 1995: 443–93.

American Psychiatric Association.. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 1994 Washington, D.C: American Psychiatric Association.

Blanchard RJ, Blanchard C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 1989; 13: 3-14

Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology* 1995;46:575–605.

Bertoglio LJ, Carobrez AP. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Research* 2000; 108: 197-203.

Bertoglio LJ, Carobrez AP. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behavioural Brain Research* 2002; 132: 135-143.

Bouwknicht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: Relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Research Bulletin* 2007; 72:32-43.

Bueno CH, Zangrossi H, Viana MB. The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2005; 38: 1697-1701.

Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2002; 26: 312-352.

Clement Y, Chaothier G. Biological bases of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1998; 22: 623-633.

Cleves M. Analysis of multiple failure-time data with Stata, *Stata Technical Bulletin* 49:30-39 May 1999.

Costa ACM. (2008) Efeitos de condições antecedentes e de contexto sobre o comportamento de ratos testados em duas sessões no labirinto em cruz elevado: tipo de piso, luminosidade ambiental, privação alimentar, treinamento e tratamento farmacológico com midazolam (Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Psicobiologia) Recuperada de <http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/PesquisaPeriodicoForm.jsp>

Conde CA, Ayala JO, Botelho S, Herrera AB, Velásquez MC .La vía visual puede ser el disparador de ansiogenicidad en el modelo del laberinto en cruz elevado. *Salud UIS* 2001; 33:190-195.

David G. Kleinbaum, Mitchel Klein. *Survival Analysis A Self-Learning Text* Second Edition, Springer.

Degroot A, Kashluba S, Treit D. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2001; 69:391–9.

Depino A, Gross C. Simultaneous assessment of autonomic function and anxiety-related behavior in BALB/c and C57BL/6 mice. *Behavioural Brain Research* 2007; 177:254-260.

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 2001; 432:307–328.

García AMB, Cardenas FP, Morato S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus maze. *Physiology & Behavior* 2005;85: 265-270.

García AMB, Cardenas F, Morato S. The effects of pentylentetrazol, chlordiazepoxide and caffeine in rats tested in the elevated plus-maze depend on the experimental illumination. *Behavioural Brain Research* 2011; 217: 171-177.

Graeff, F. G., Guimeras, T. S., & De Andrade, T. G. (1996). Role of 5- HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 86, 334± 338.

Griebel G, Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Misslin R. Some critical determinants of the behavior of rats in the elevated plus-maze. *Behavioural Processes* 1993; 29:37-48.

Singewald N. Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2007; 31:18-40.

Hale MW, Bouwknecht JA, Spiga F, Shekhar A, Lowry CA. Exposure to high and low light conditions in an open-field test of anxiety increases c-Fos expression in specific subdivisions of the rat basolateral amygdaloid complex. *Brain Research Bulletin* 2006; 71:174-182.

Hale MW, Hay-Schmidt A, Mikkelsen JD, Poulsen B, Shekhar A, Lowry CA. Exposure to an open-field arena increases c-fos expression in a distributed anxiety-related system projecting to basolateral amygdaloid complex. *Neuroscience* 2008; 155: 659-672.

Jardim MC, Guimaraes FS. GABAergic and glutamatergic modulation of exploratory behavior in the dorsomedial hypothalamus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2001;69: 579–84.

Jardim MC, Aguiar FA, Moreira FS, Guimaraes FS. Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2005;82:182–189.

Jennings JH, Sparta DR, Stamatakis AM, Ung RL, Pleil KE, Kash TL, Stuber GD. Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. *Nature* 2013; 496: 224-228.

Jones N, King SM. Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiology & Behavior* 2001; 72:99-106.

Kabbaj M, Akil H. Individual differences in novelty-seeking behavior in rats: a c-fos study. *Neuroscience* 2001; 3:535-545.

Kalman BA, Kim PJ, Cole MA, Chi MS, Spencer RL. Diazepam attenuation of restraint stress-induced corticosterona levels is enhanced by prior exposure to repeated restraint. *Psychoneuroendocrinology* 1997; 22:349-360.

Kelley AE. Neural integrative activities of nucleus accumbens subregions in relation to learning and motivation. *Psychobiology* 1999; 27,198–213.

Kim SY, Adhikari A, Lee SY, Marshel JH, Kim CK, Mallory CS, Lo M, Pak S, Mattis J, Lim BK, Malenka RC, Warden MR, Neve R, Tye KM, Deisseroth K. Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. *Nature* 2013; 496:219- 223.

Lacroix L, Spinelli S, Heidbreder CA, Feldon J. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behavioural Neuroscience* 2000;114: 1119–30

LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annuals Reviews Neuroscience* 2000; 23, 155-184.

Letón E, Zuluaga P. Cómo elegir el test adecuado para comparar curvas de supervivencia. *Medicina Clínica* 2006; 127: 96-99.

Louie A K, Lannon R A, Ketter TA. Treatment of cocaine induced panic disorder. *American Journal of Psychiatry* 1989 ;146:40-44.

Moreira CM, Masson S, Carvalho M, Brandao ML. Exploratory behavior of rats in the elevated plus-maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and central amygdaloid nuclei. *Brain Research Bulletin* 2007; 71: 466-474.

Novak CM, Harris JA, Smale L, Nunez AA. Suprachiasmatic nucleus projections to the paraventricular thalamic nucleus in nocturnal rats (*Rattus norvegicus*) and diurnal rats (*Arvicanthis niloticus*). Brain Research 2000; 874:147-157.

Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in a elevated plus maze: a novel test of anxiety in the rat. Pharmacology Biochemistry and Behaviour 1986; 24:525-529.

Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. Neuron 2005; 48: 175-187.

Prentice, R. L., B. J. Williams, and A. V. Peterson. 1981. On the regression analysis of multivariate failure time data. Biometrika 68: 373–379.

Rezayat M, Roohbakhsh A, Zarrindast MR, Massoudi R, Djahanguiri B. Cholecystinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. Physiology Behavioural 2005;84: 775–82.

Reis LM, Canto-de-Souza A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. Brain Research 2008; 1231:93-102.

Russo AS, Guimaraes FS, Aguiar JC, Graeff FG. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray of rats in anxiety. Psychopharmacology 1993;110:198–202.

Timofeeva E, Richard D. Activation of the central nervous system in obese Zucker rats during food deprivation. Journal of Comparative Neurology 2001;441:71–89.

Van der Werf YD, Witter MP, Groenewegen HJ. The intralaminar and midline nuclei of the thalamus: Anatomical and functional evidence for participation in

processes of arousal and awareness. *Brain Research Reviews* 2002; 39: 107–140.

Walker P, Carrive P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. *Neuroscience* 2003;116:897–912.

Yehuda, R. Biology of posttraumatic stress disorder. *Journal Clinic of Psychiatry* 2001; 62:41–46.

## ANEXOS

### Anexo A. Obtención de la concentración de corticosterona plasmática.

**Tabla 1.** Descripción de los nombres utilizados

<b>Variables</b>		
<b>Fármaco</b>	<b>LUZ/OSC</b>	<b>Lugar</b>
SS=0	OSC=0	Caja=0
DZP=1	LUZ=1	LCE=1

**Tabla 2.** Valores de absorbancia medidos y ajustados

<b>Concentración conocida (ng/ml)</b>	<b>VALORES DE ABSORBANCIA MEDIDOS</b>		<b>ABSORBANCIA DEL AJUSTE</b>	
	abs(día 1)	abs(día 2)	abs(res-día1)	abs(res-día2)
0	2.142	2.306	2.2731254	2.243428119
15	2.168	2.282	2.17346013	2.147353519
50	1.737	1.997	1.95938871	1.941191261
185	1.149	1.181	1.33237382	1.33920962
640	0.635	0.525	0.47063604	0.519641152
2250	0.229	0.295	0.22913783	0.294994405

**Tabla 3.** Parámetros de la ecuación

<b>PARAMETROS DE LA ECUACION</b>		
	DIA 1	DIA2
LA:	0.228	0.294
ln(K1):	0.71545911	0.667536057
1/K2:	-0.00333071	-0.00336929
Coef corr	-0.99605373	-0.99960662
K1	2.0451254	1.949428119
K2	-300.236647	-296.7984598

RATA	ABS	Concentración (ng/ml)	Luz/Osc	Fármaco	Lugar
SLC1	1.25	208.27	1	0	0
SLC2	0.92	325.34	1	0	0
SLC3	0.97	304.40	1	0	0
SLC4	0.98	300.38	1	0	0
SLC5	1.14	247.76	1	0	0
SLC6	1.16	240.82	1	0	0
SLC7	1.09	265.84	1	0	0
SLC8	1.14	247.76	1	0	0
SLL1	1.05	273.66	1	0	1
SLL2	1.25	208.27	1	0	1
SLL3	1.09	259.39	1	0	1
SLL4	1.18	234.05	1	0	1
SLL5	1.1	262.13	1	0	1
SLL6	0.81	394.50	1	0	1
SLL7	1.12	254.86	1	0	1
SLL8	1.19	230.72	1	0	1
DLC1	1.17	232.75	1	1	0
DLC2	0.94	316.79	1	1	0
DLC3	1.17	232.75	1	1	0
DLC4	0.83	367.18	1	1	0
DLC5	1.1	262.13	1	1	0
DLC6	0.99	305.69	1	1	0
DLC7	1.03	289.10	1	1	0
DLC8	0.94	327.81	1	1	0
DLL1	1.01	288.64	1	1	1
DLL2	0.73	421.72	1	1	1
DLL3	1.13	245.77	1	1	1
DLL4	0.9	346.78	1	1	1
DLL5	1.14	247.76	1	1	1

DLL6	0.9	346.78	1	1	1
DLL7	0.82	388.80	1	1	1
DLL8	0.85	372.34	1	1	1
SOC1	1.18	229.58	0	0	0
SOC2	1.04	277.33	0	0	0
SOC3	1.19	226.44	0	0	0
SOC4	1.07	266.44	0	0	0
SOC5	1.36	179.15	0	0	0
SOC6	1.07	273.39	0	0	0
SOC7	1.36	179.15	0	0	0
SOC8	1.24	214.60	0	0	0
SOL1	1.07	266.44	0	0	1
SOL2	1.53	135.57	0	0	1
SOL3	1.05	273.66	0	0	1
SOL4	1.11	252.51	0	0	1
SOL5	1.32	188.38	0	0	1
SOL6	1.11	258.47	0	0	1
SOL7	1.16	240.82	0	0	1
SOL8	1.29	199.31	0	0	1
DOC1	0.86	352.58	0	1	0
DOC2	0.91	329.72	0	1	0
DOC3	0.88	343.22	0	1	0
DOC4	1.06	277.24	0	1	0
DOC5	0.95	323.25	0	1	0
DOC6	1.09	265.84	0	1	0
DOC7	0.78	412.28	0	1	0
DOC8	1.39	170.92	0	1	0
DOL1	1.2	223.33	0	1	1
DOL2	0.9	334.15	0	1	1
DOL3	1.36	177.58	0	1	1
DOL4	1.04	285.09	0	1	1
DOL5	0.98	309.98	0	1	1
DOL6	1.08	269.59	0	1	1
DOL7	1.05	281.14	0	1	1
DOL8	0.77	418.45	0	1	1

## Anexo B. Experimento 1. Resultados Variables Comportamentales.

**Tabla 1.** Descripción de los nombres utilizados

Grupo Experimental	Variables	
	Fármaco	LUZ/OSC
<b>0</b>	SS=0	LUZ=1
<b>1</b>	DZP=1	LUZ=1
<b>2</b>	SS=0	OSC=0
<b>3</b>	DZP=1	OSC=0

**Tabla 2.** Resultados estadísticos de Anova de una vía aplicada a los grupos experimentales.

Comportamientos	Comparación	5 MINUTOS		15 MINUTOS	
		q	P	q	P
% Entradas a los Brazos Abiertos	0 vs 1	3.128	>0.05	1.497	>0.05
	0 vs 2	8.681	<0.001	6.284	<0.05
	1 vs 3	7.629	<0.001	6.297	<0.05
	2 vs 3	2.076	>0.05	1.511	>0.05
Tiempo en los Brazos Abiertos	0 vs 1	1.383	>0.05	0.363	>0.05
	0 vs 2	6.338	<0.05	6.083	<0.05
	1 vs 3	6.15	<0.05	6.673	<0.05
	2 vs 3	1.195	>0.05	0.953	>0.05
Entradas al Extremo del Brazo Abierto	0 vs 1	1.887	>0.05	0	>0.05
	0 vs 2	5.639	<0.05	5.727	<0.05
	1 vs 3	5.68	<0.05	6.787	<0.05
	2 vs 3	5.927	<0.05	1.061	>0.05
Tiempo en el Extremo del Brazo Abierto	0 vs 1	1.148	>0.05	0.04	>0.05
	0 vs 2	6.129	<0.05	5.921	<0.05
	1 vs 3	6.613	<0.05	7.049	<0.05
	2 vs 3	1.631	>0.05	1.168	>0.05
Tiempo de Valoración de Riesgo	0 vs 1	4.961	<0.05	4.793	<0.05
	0 vs 2	4.31	<0.05	1.336	>0.05
	1 vs 3	1.705	NT	0.316	NT
	2 vs 3	2.336	>0.05	3.742	<0.05

**Grupo 0** Salina y Luz (SL), **Grupo 1** Diazepam y Luz (DL), **Grupo 2** Salina y Oscuridad (SO) y **Grupo 3** Diazepam y Oscuridad (DO).

%EBA				
GRUPO	FARMACO	LUZ/OSC	5MINUTOS	15 MINUTOS
0	0	1	0.0	16.7
0	0	1	0.0	0.0
0	0	1	26.3	23.1
0	0	1	16.7	10.0
0	0	1	14.3	22.2
0	0	1	33.3	23.1
0	0	1	23.5	24.3
0	0	1	36.4	26.7
0	0	1	16.7	31.3
0	0	1	33.3	24.0
0	0	1	11.8	10.0
0	0	1	0.0	0.0
0	0	1	41.7	38.9
0	0	1	0.0	11.1
0	0	1	18.8	20.6
0	0	1	0.0	0.0
1	1	1	16.7	16.7
1	1	1	0.0	0.0
1	1	1	14.3	8.3
1	1	1	25.0	35.3
1	1	1	50.0	36.4
1	1	1	44.4	44.4
1	1	1	31.8	33.3
1	1	1	50.0	50.0
1	1	1	50.0	41.4
1	1	1	50.0	35.3
1	1	1	33.3	27.3
1	1	1	12.5	12.5
1	1	1	41.7	41.7
1	1	1	0.0	0.0
1	1	1	18.8	23.3

1	1	1	14.3	14.3
2	0	0	50.0	46.5
2	0	0	45.5	59.4
2	0	0	52.6	52.3
2	0	0	50.0	50.0
2	0	0	61.5	56.4
2	0	0	25.0	37.5
2	0	0	53.8	57.1
2	0	0	53.3	56.5
2	0	0	44.4	53.5
2	0	0	31.3	31.7
2	0	0	64.3	66.7
2	0	0	46.2	53.3
2	0	0	66.7	63.2
2	0	0	20.0	16.7
2	0	0	61.1	54.5
2	0	0	46.7	53.6
3	1	0	47.6	58.5
3	1	0	69.2	59.4
3	1	0	64.0	63.9
3	1	0	43.8	40.9
3	1	0	47.6	47.6
3	1	0	72.7	60.0
3	1	0	50.0	50.0
3	1	0	63.6	61.2
3	1	0	61.9	60.0
3	1	0	73.3	74.1
3	1	0	44.0	55.1
3	1	0	42.9	42.9
3	1	0	61.9	63.9
3	1	0	43.8	57.9
3	1	0	55.6	59.6
3	1	0	50.0	50.0

**Porcentaje de Entradas a los Brazos Abiertos a los 5 minutos de experimento**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** %EBA

Dependent Variable: 300 segundos ( 5minutos)

**Normality Test:** Passed (P = 0.385)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.102)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
0.000	16	0	17.042	14.444	3.611
1.000	16	0	28.297	17.967	4.492
2.000	16	0	48.274	13.361	3.340
3.000	16	0	55.743	10.881	2.720

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	15231.9525077	5077.317	24.518	<0.001
Residual	60	12425.060207	207.084		
Total	63	27657.012			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **GRUPO**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
3.000 vs. 0.000	38.701		410.757	<0.001	Yes
3.000 vs. 1.000	27.446		47.629	<0.001	Yes
3.000 vs. 2.000	7.469		42.076	0.463	No
2.000 vs. 0.000	31.232		48.681	<0.001	Yes
2.000 vs. 1.000	19.977		45.553	0.001	Yes
1.000 vs. 0.000	11.255		43.128	0.132	No

## Porcentaje de Entradas a los Brazos Abiertos a los 15 minutos de experimento

### One Way Analysis of Variance

Data source: %EBA

Dependent Variable: 900 segundos (15 minutos)

**Normality Test:** Failed ( $P < 0.050$ )

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in %EBA ANOVA 1 VIA.SNB

Group	N	Missing	Median	25%	75%
0.000	16	0	21.405	10.000	24.162
1.000	16	0	30.303	13.393	38.871
2.000	16	0	53.530	48.256	56.832
3.000	16	0	58.956	50.000	60.612

$H = 41.871$  with 3 degrees of freedom. ( $P = < 0.001$ )

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = < 0.001$ )

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
3 vs 0	580.500	7.794	Yes
3 vs 1	469.000	6.297	Yes
3 vs 2	112.500	1.511	No
2 vs 0	468.000	6.284	Yes
2 vs 1	356.500	4.787	Yes
1 vs 0	111.500	1.497	No

TBA				
GRUPO	FARMACO	LUZ/OSC	5MINUTOS	15 MINUTOS
0	0	1	0	36.29
0	0	1	0	0
0	0	1	39.52	75.64
0	0	1	12.57	12.57
0	0	1	13.38	61.24
0	0	1	60.56	60.56
0	0	1	22.51	83.08
0	0	1	38.09	38.09
0	0	1	6.41	55.64
0	0	1	58.83	105.34
0	0	1	12.51	20.72
0	0	1	0	0
0	0	1	42.53	54.03
0	0	1	0	4.76
0	0	1	26.98	94.53
0	0	1	0	0
1	1	1	7.63	7.63
1	1	1	0	0
1	1	1	5.76	5.76
1	1	1	31.6	46.61
1	1	1	56.57	58.76
1	1	1	72.88	72.88
1	1	1	54.6	74.48
1	1	1	86.41	104.74
1	1	1	100.91	131.28
1	1	1	138.01	142.95
1	1	1	40.35	40.35
1	1	1	9.11	22.49
1	1	1	51.6	51.6
1	1	1	0	0
1	1	1	29.38	85.89

1	1	1	5.92	5.92
2	0	0	108.22	285.02
2	0	0	131.83	536.06
2	0	0	143.16	443.46
2	0	0	173.8	365.3
2	0	0	192.06	543.65
2	0	0	59.54	222.13
2	0	0	195.24	529.15
2	0	0	224.08	714.45
2	0	0	139.44	417.66
2	0	0	79.64	280.99
2	0	0	265.66	688.86
2	0	0	159.29	415.99
2	0	0	189.83	469.74
2	0	0	3.07	3.07
2	0	0	154.18	359.91
2	0	0	122.68	274.86
3	1	0	155.07	643.74
3	1	0	233.96	718.81
3	1	0	166.77	425.65
3	1	0	153.18	187.32
3	1	0	80.68	332.6
3	1	0	219.9	499.95
3	1	0	817.27	817.27
3	1	0	206.7	463.1
3	1	0	208.94	532.53
3	1	0	264.74	755.6
3	1	0	154.15	570.77
3	1	0	70.61	70.61
3	1	0	217.71	703.82
3	1	0	74.34	354.86
3	1	0	134.35	435.41
3	1	0	160.08	160.08

## Tiempo en los Brazos Abiertos a los 5 minutos de experimento

### One Way Analysis of Variance

Data source: TBA

Dependent Variable: 300 segundos (5 minutos)

Normality Test: Failed ( $P < 0.050$ )

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: TBA

Group	N	Missing	Median	25%	75%
0.000	16	0	12.975	0.000	38.805
1.000	16	0	35.975	6.775	64.725
2.000	16	0	148.670	115.450	190.945
3.000	16	0	163.425	143.765	218.805

H = 40.705 with 3 degrees of freedom. ( $P = <0.001$ )

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ )

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
3 vs 0	561.000	7.533	Yes
3 vs 1	458.000	6.150	Yes
3 vs 2	89.000	1.195	No
2 vs 0	472.000	6.338	Yes
2 vs 1	369.000	4.955	Yes
1 vs 0	103.000	1.383	No

## Tiempo en los Brazos Abiertos a los 15 minutos de experimento

### One Way Analysis of Variance

Data source: TBA

Dependent Variable: 900 segundos (15 minutos)

Normality Test: Failed ( $P < 0.050$ )

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: TBA

Group	N	Missing	Median	25%	75%
0.000	16	0	46.060	8.665	68.440
1.000	16	0	49.105	6.775	80.185
2.000	16	0	416.825	283.005	532.605
3.000	16	0	481.525	343.730	673.780

$H = 41.217$  with 3 degrees of freedom. ( $P = <0.001$ )

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ )

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	$P < 0.05$
3 vs 0	524.000	7.036	Yes
3 vs 1	497.000	6.673	Yes
3 vs 2	71.000	0.953	No
2 vs 0	453.000	6.083	Yes
2 vs 1	426.000	5.720	Yes
1 vs 0	27.000	0.363	No

Entradas al final del Brazo Abierto				
GRUPO	FARMACO	LUZ/OSC	5MINUTOS	15 MINUTOS
0	0	1	0	2
0	0	1	0	0
0	0	1	2	4
0	0	1	0	0
0	0	1	0	2
0	0	1	3	3
0	0	1	0	4
0	0	1	1	1
0	0	1	0	3
0	0	1	2	5
0	0	1	0	1
0	0	1	0	0
0	0	1	3	4
0	0	1	0	0
0	0	1	1	5
0	0	1	0	0
1	1	1	0	2
1	1	1	0	0
1	1	1	0	4
1	1	1	0	0
1	1	1	3	2
1	1	1	5	3
1	1	1	3	4
1	1	1	6	1
1	1	1	7	3
1	1	1	10	5
1	1	1	1	1
1	1	1	0	0
1	1	1	3	4
1	1	1	0	0
1	1	1	2	5

1	1	1	0	0
2	0	0	4	9
2	0	0	4	16
2	0	0	7	17
2	0	0	4	7
2	0	0	9	19
2	0	0	2	8
2	0	0	7	17
2	0	0	7	12
2	0	0	9	23
2	0	0	4	11
2	0	0	11	24
2	0	0	6	16
2	0	0	11	22
2	0	0	0	0
2	0	0	6	17
2	0	0	5	9
3	1	0	10	22
3	1	0	10	20
3	1	0	15	32
3	1	0	7	7
3	1	0	5	13
3	1	0	8	23
3	1	0	6	6
3	1	0	14	33
3	1	0	13	23
3	1	0	11	21
3	1	0	10	24
3	1	0	3	3
3	1	0	10	18
3	1	0	4	16
3	1	0	10	25
3	1	0	4	4

## Entradas al extremo del Brazo Abierto a los 5 minutos de experimento

### One Way Analysis of Variance

Data source: Entradas al final del BA

Dependent Variable: 300 segundos (5minutos)

Normality Test: Failed ( $P < 0.050$ )

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Entradas al final del BA

Group	N	Missing	Median	25%	75%
0.000	16	0	0.000	0.000	1.500
1.000	16	0	1.500	0.000	4.000
2.000	16	0	6.000	4.000	8.000
3.000	16	0	10.000	5.500	10.500

$H = 36.611$  with 3 degrees of freedom. ( $P = <0.001$ )

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ )

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
3 vs 0	563.500	7.566	Yes
3 vs 1	423.000	5.680	Yes
3 vs 2	143.500	1.927	No
2 vs 0	420.000	5.639	Yes
2 vs 1	279.500	3.753	Yes
1 vs 0	140.500	1.887	No

## Entradas al extremo del Brazo Abierto a los 15 minutos de experimento

### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Entradas al final del BA

Dependent Variable: 15 MINUTOS

**Normality Test:** Failed ( $P < 0.050$ )

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

**Data source:** Entradas al final del BA

Group	N	Missing	Median	25%	75%
0.000	16	0	2.000	0.000	4.000
1.000	16	0	2.000	0.000	4.000
2.000	16	0	16.000	9.000	18.000
3.000	16	0	20.500	10.000	23.500

$H = 40.027$  with 3 degrees of freedom. ( $P = <0.001$ )

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ )

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
3 vs 1	505.500	6.787	Yes
3 vs 0	505.500	6.787	Yes
3 vs 2	79.000	1.061	No
2 vs 1	426.500	5.727	Yes
2 vs 0	426.500	5.727	Yes
0 vs 1	0.000	0.000	No

Tiempo en el extremo del Brazo Abierto				
GRUPO	FARMACO	LUZ/OSC	5MINUTOS	15 MINUTOS
0	0	1	0	11
0	0	1	0	0
0	0	1	12	21
0	0	1	0	0
0	0	1	0	29
0	0	1	26	26
0	0	1	0	22
0	0	1	13	13
0	0	1	0	28
0	0	1	9	29
0	0	1	0	3
0	0	1	0	0
0	0	1	11	15
0	0	1	0	0
0	0	1	10	46
0	0	1	0	0
1	1	1	0	0
1	1	1	0	0
1	1	1	0	0
1	1	1	0	7
1	1	1	23	23
1	1	1	35	35
1	1	1	18	29
1	1	1	27	27
1	1	1	38	48
1	1	1	42	42
1	1	1	3	3
1	1	1	0	5
1	1	1	16	16
1	1	1	0	0
1	1	1	8	19

1	1	1	0	0
2	0	0	29	96
2	0	0	69	298
2	0	0	64	197
2	0	0	47	119
2	0	0	109	300
2	0	0	19	113
2	0	0	81	243
2	0	0	99	410
2	0	0	54	196
2	0	0	41	171
2	0	0	116	414
2	0	0	93	240
2	0	0	120	254
2	0	0	0	0
2	0	0	51	152
2	0	0	45	122
3	1	0	72	417
3	1	0	104	453
3	1	0	79	157
3	1	0	88	88
3	1	0	39	163
3	1	0	148	302
3	1	0	776	776
3	1	0	111	278
3	1	0	125	263
3	1	0	145	589
3	1	0	93	270
3	1	0	45	45
3	1	0	102	417
3	1	0	30	196
3	1	0	56	179
3	1	0	73	73

## Tiempo en el extremo del Brazo Abierto a los 5 minutos de experimento

### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Tiempo en el extremo del BA

Dependent Variable: 300 segundos (5 minutos)

**Normality Test:** Failed ( $P < 0.050$ )

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
0.000	16	0	0.000	0.000	10.095
1.000	16	0	5.260	0.000	25.050
2.000	16	0	59.330	43.150	96.245
3.000	16	0	90.365	64.380	117.915

$H = 43.548$  with 3 degrees of freedom. ( $P = <0.001$ )

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ )

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
3 vs 0	578.000	7.761	Yes
3 vs 1	492.500	6.613	Yes
3 vs 2	121.500	1.631	No
2 vs 0	456.500	6.129	Yes
2 vs 1	371.000	4.981	Yes
1 vs 0	85.500	1.148	No

## Tiempo en el extremo del Brazo Abierto a los 15 minutos de experimento

### One Way Analysis of Variance

**Data source:** tiempo en el extremo del ba in tiempo en el extremo del BA

Dependent Variable: 900 segundos (15 minutos)

**Normality Test:** Failed ( $P < 0.050$ )

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

**Data source:** tiempo en el extremo del ba in tiempo en el extremo del BA

Group	N	Missing	Median	25%	75%
0.000	16	0	13.690	0.000	26.760
1.000	16	0	11.140	0.000	27.965
2.000	16	0	196.770	120.660	276.035
3.000	16	0	266.545	159.955	417.015

H = 42.959 with 3 degrees of freedom. ( $P = <0.001$ )

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ )

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
3 vs 0	528.000	7.090	Yes
3 vs 1	525.000	7.049	Yes
3 vs 2	87.000	1.168	No
2 vs 0	441.000	5.921	Yes
2 vs 1	438.000	5.881	Yes
1 vs 0	3.000	0.0403	No

Frecuencia transición 3-4				
GRUPO	FARMACO	LUZ/OSC	5MINUTOS	15 MINUTOS
0	0	1	10	19
0	0	1	5	11
0	0	1	14	30
0	0	1	4	8
0	0	1	11	20
0	0	1	5	9
0	0	1	12	27
0	0	1	7	11
0	0	1	4	10
0	0	1	5	18
0	0	1	14	26
0	0	1	6	8
0	0	1	5	9
0	0	1	4	7
0	0	1	12	26
0	0	1	5	7
1	1	1	4	4
1	1	1	0	0
1	1	1	6	11
1	1	1	7	10
1	1	1	6	13
1	1	1	4	4
1	1	1	14	17
1	1	1	5	7
1	1	1	9	16
1	1	1	10	21
1	1	1	11	15
1	1	1	6	13
1	1	1	6	6
1	1	1	1	1
1	1	1	12	22

1	1	1	5	5
2	0	0	8	23
2	0	0	6	12
2	0	0	9	21
2	0	0	6	11
2	0	0	5	17
2	0	0	5	14
2	0	0	6	15
2	0	0	6	9
2	0	0	10	19
2	0	0	11	27
2	0	0	5	12
2	0	0	6	13
2	0	0	5	14
2	0	0	2	3
2	0	0	6	19
2	0	0	9	13
3	1	0	11	17
3	1	0	4	13
3	1	0	9	22
3	1	0	8	12
3	1	0	10	22
3	1	0	2	14
3	1	0	6	6
3	1	0	8	18
3	1	0	8	17
3	1	0	4	7
3	1	0	14	22
3	1	0	3	3
3	1	0	8	13
3	1	0	9	16
3	1	0	7	19
3	1	0	2	2

## Frecuencia transición 3-4 a los 5 minutos de experimento

### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Frecuencia transición 3-4

Dependent Variable: 300 segundos (5 minutos)

**Normality Test:** Failed ( $P < 0.050$ )

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

**Data source:** Frecuencia 3-4 in Frecuencia 3-4

Group	N	Missing	Median	25%	75%
0.000	16	0	5.500	5.000	11.500
1.000	16	0	6.000	4.500	9.500
2.000	16	0	6.000	5.000	8.500
3.000	16	0	8.000	4.000	9.000

$H = 0.274$  with 3 degrees of freedom. ( $P = 0.965$ )

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ( $P = 0.965$ )

## Frecuencia transición 3-4 a los 15 minutos de experimento

### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Frecuencia transición 3-4

Dependent Variable: 900 segundos (15 minutos)

**Normality Test:** Passed ( $P = 0.587$ )

**Equal Variance Test:** Passed ( $P = 0.474$ )

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
0.000	16	0	15.375	8.221	2.055
1.000	16	0	10.313	6.809	1.702

2.000	16	0	15.125	5.795	1.449
3.000	16	0	13.938	6.527	1.632

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	261.875	87.292	1.837	0.150
Residual	60	2851.875	47.531		
Total	63	3113.750			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.150).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.214

Tiempo de transición 3-4				
GRUPO	FARMACO	LUZ/OSC	5MINUTOS	15 MINUTOS
0	0	1	77.84	98.87
0	0	1	35.76	104.66
0	0	1	54.21	147.20
0	0	1	16.87	68.27
0	0	1	70.27	86.42
0	0	1	47.17	90.54
0	0	1	48.18	100.25
0	0	1	53.99	105.64
0	0	1	33.92	79.16
0	0	1	42.99	118.73
0	0	1	50.25	129.82
0	0	1	45.84	57.81
0	0	1	25.31	36.04
0	0	1	20.31	37.82
0	0	1	49.29	135.34
0	0	1	51.22	82.35
1	1	1	15.32	15.32
1	1	1	0.00	0.00
1	1	1	44.81	90.54
1	1	1	10.55	124.61
1	1	1	31.10	39.84
1	1	1	11.94	11.94
1	1	1	42.40	62.82
1	1	1	8.01	11.30
1	1	1	20.17	29.24
1	1	1	21.28	49.23
1	1	1	14.66	16.34
1	1	1	30.51	77.27
1	1	821	7.80	7.80
1	1	1	20.54	20.54
1	1	1	72.79	139.03

1	1	1	16.70	16.70
2	0	0	22.51	96.86
2	0	0	35.13	59.59
2	0	0	38.21	103.21
2	0	0	39.75	143.15
2	0	0	13.01	74.13
2	0	0	33.27	94.36
2	0	0	21.94	69.46
2	0	0	8.88	18.42
2	0	0	20.44	38.02
2	0	0	45.83	156.70
2	0	0	10.61	24.20
2	0	0	17.62	44.38
2	0	0	6.24	57.56
2	0	0	18.94	45.96
2	0	0	15.59	142.09
2	0	0	29.26	97.46
3	1	0	22.33	35.25
3	1	0	5.45	12.97
3	1	0	13.42	58.61
3	1	0	17.52	31.40
3	1	0	45.66	243.56
3	1	0	4.05	53.36
3	1	0	12.87	12.87
3	1	0	14.22	53.21
3	1	0	8.03	38.85
3	1	0	7.52	12.94
3	1	0	25.71	71.09
3	1	0	5.77	5.77
3	1	0	13.51	53.91
3	1	0	40.98	95.81
3	1	0	10.32	56.00
3	1	0	11.31	11.31

**Tiempo de transición 3-4 a los 5 minutos de experimento**  
**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Tiempo transición 3-4  
 Dependent Variable: 300 segundos (5 minutos)

**Normality Test:** Failed(P < 0.050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

**Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks**  
**Data source:** Tiempo transición 3-4

Group	N	Missing	Median	25%	75%
0.000	16	0	47.675	34.840	52.605
1.000	16	0	18.435	11.245	30.805
2.000	16	0	21.190	14.300	34.200
3.000	16	0	13.145	7.775	19.925

H = 23.983 with 3 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
0 vs 3	495.000	6.646	Yes
0 vs 1	368.000	4.941	Yes
0 vs 2	321.000	4.310	Yes
2 vs 3	174.000	2.336	No
2 vs 1	47.000	0.631	Do Not Test
1 vs 3	127.000	1.705	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between the two rank sums that enclose that comparison. For example, if you had four rank sums sorted in order, and found no significant difference

between rank sums 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the

### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Tiempo transición 3-4

Dependent Variable: 900 segundos (15 minutos)

**Normality Test:** Failed ( $P < 0.050$ )

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

**Data source:** Tiempo transición 3-4

Group	N	Missing	Median	25%	75%
0.000	16	0	94.705	73.715	112.185
1.000	16	0	24.890	13.630	70.045
2.000	16	0	71.795	45.170	100.335
3.000	16	0	46.030	12.955	57.305

$H = 16.685$  with 3 degrees of freedom. ( $P = <0.001$ )

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ )

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	$P < 0.05$
0 vs 1	357.000	4.793	Yes
0 vs 3	333.500	4.478	Yes
0 vs 2	99.500	1.336	No
2 vs 1	257.500	3.457	No
2 vs 3	294.000	3.742	Yes
3 vs 1	23.500	0.316	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between the two rank sums that enclose that comparison. For example, if you had four rank sums sorted in order, and found no significant difference between rank sums 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed rank sums is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the rank sums, even though one may appear to exist.

EBC				
GRUPO	FARMACO	LUZ/OSC	5MINUTOS	15 MINUTOS
0	0	1	11	20
0	0	1	6	12
0	0	1	14	30
0	0	1	5	9
0	0	1	12	21
0	0	1	6	10
0	0	1	13	28
0	0	1	7	11
0	0	1	5	11
0	0	1	6	19
0	0	1	15	27
0	0	1	7	9
0	0	1	7	11
0	0	1	5	8
0	0	1	13	27
0	0	1	6	8
1	1	1	5	5
1	1	1	1	1
1	1	1	6	11
1	1	1	9	11
1	1	1	7	14
1	1	1	5	5
1	1	1	15	18
1	1	1	6	8
1	1	1	10	17
1	1	1	11	22
1	1	1	12	16
1	1	1	7	14
1	1	1	7	7
1	1	1	1	1
1	1	1	13	23

1	1	1	6	6
2	0	0	9	23
2	0	0	6	13
2	0	0	9	21
2	0	0	6	11
2	0	0	5	17
2	0	0	6	15
2	0	0	6	15
2	0	0	7	10
2	0	0	10	20
2	0	0	11	28
2	0	0	5	12
2	0	0	7	14
2	0	0	5	14
2	0	0	4	5
2	0	0	7	20
2	0	0	8	13
3	1	0	11	17
3	1	0	4	13
3	1	0	9	22
3	1	0	9	13
3	1	0	11	22
3	1	0	3	16
3	1	0	5	5
3	1	0	8	19
3	1	0	8	18
3	1	0	4	7
3	1	0	14	22
3	1	0	4	4
3	1	0	8	13
3	1	0	9	16
3	1	0	8	19
3	1	0	3	3

**Entradas a los Brazos Cerrados a los 5 minutos de experimento**  
**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** EBC

Dependent Variable: 300 segundos (5 minutos)

**Normality Test:** Passed (P = 0.079)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.281)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
0.000	16	0	8.625	3.649	0.912
1.000	16	0	7.563	3.932	0.983
2.000	16	0	6.938	1.982	0.496
3.000	16	0	7.375	3.243	0.811

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	324.625	8.208	0.760	0.521
Residual	60	60648.375	10.806		
Total	63	63673.000			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.521).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.049

The power of the performed test (0.049) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

**Entradas a los Brazos Cerrados a los 15 minutos de experimento**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** EBC

Dependent Variable: 900 segundos (15 minutos)

**Normality Test:** Passed (P = 0.492)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.494)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
------------	---	---------	------	---------	-----

0.000	16	0	16.313	8.097	2.024
1.000	16	0	11.188	6.901	1.725
2.000	16	0	15.688	5.630	1.407
3.000	16	0	14.313	6.468	1.617

<b>Source of Variation</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Between Groups		3250.250	83.417	1.787	0.159
Residual		602800.750	46.679		
Total		633051.000			

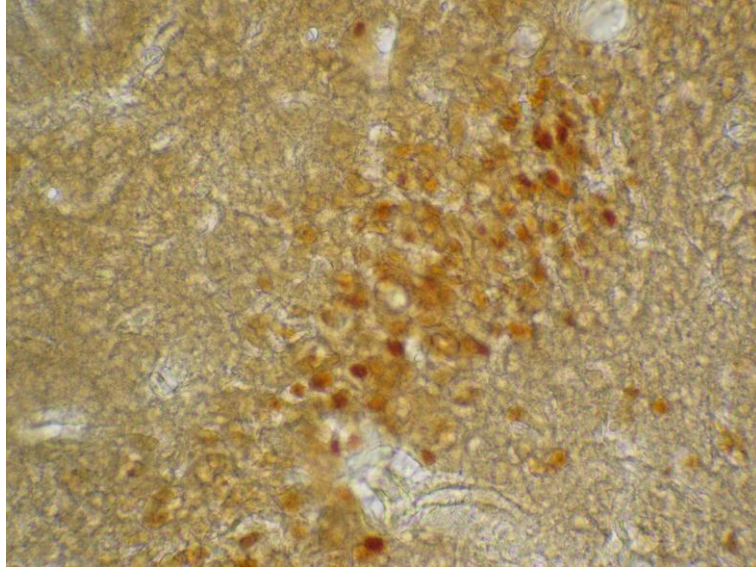
The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ( $P = 0.159$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 0.203

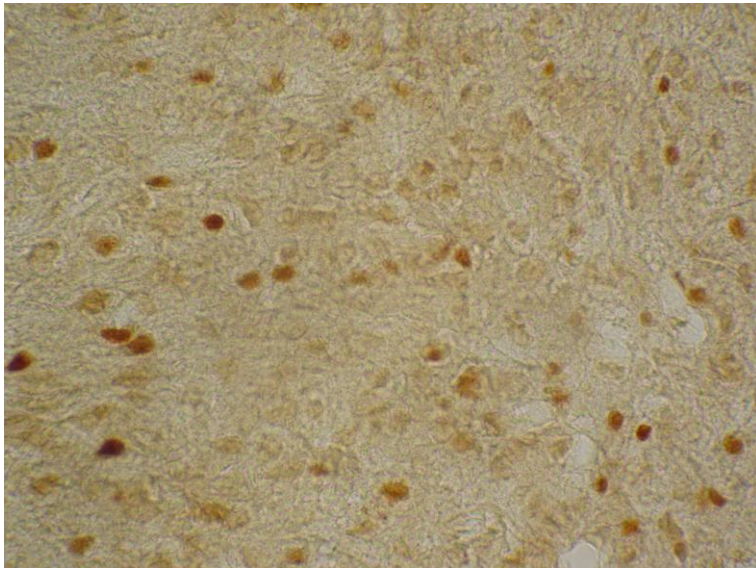
The power of the performed test (0.203) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

**Anexo C. Imágenes de los cortes realizados**

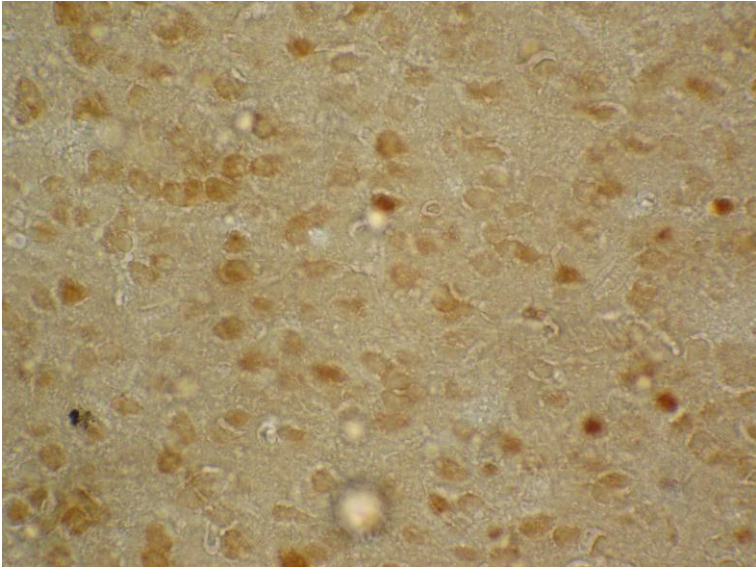
**Corteza Piriforme (DLL)**



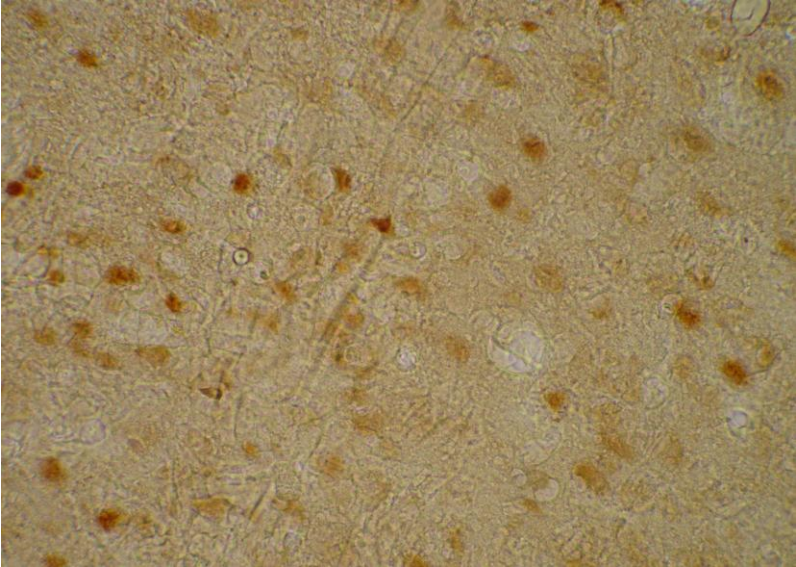
**Corteza Infra límbica ( DLL)**



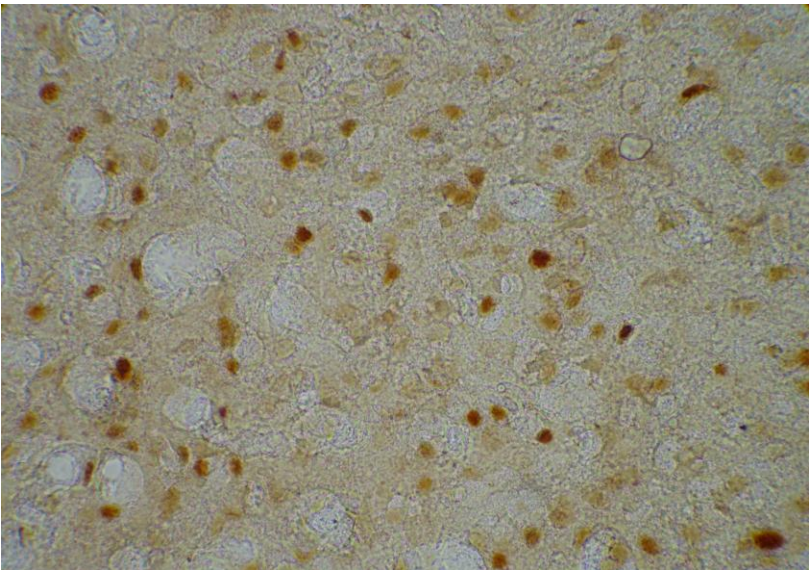
**Corteza Pre límbica (DLL)**



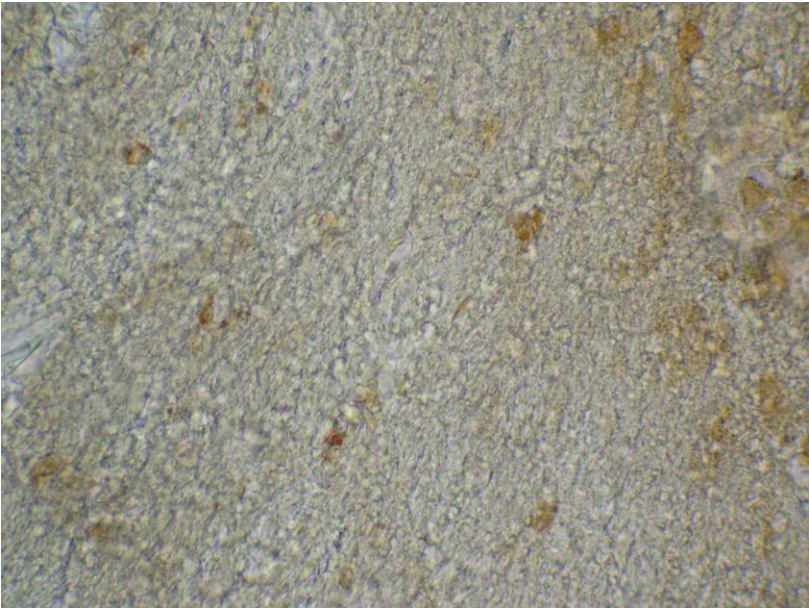
**Corteza Cingulada, área 1 (DOL)**



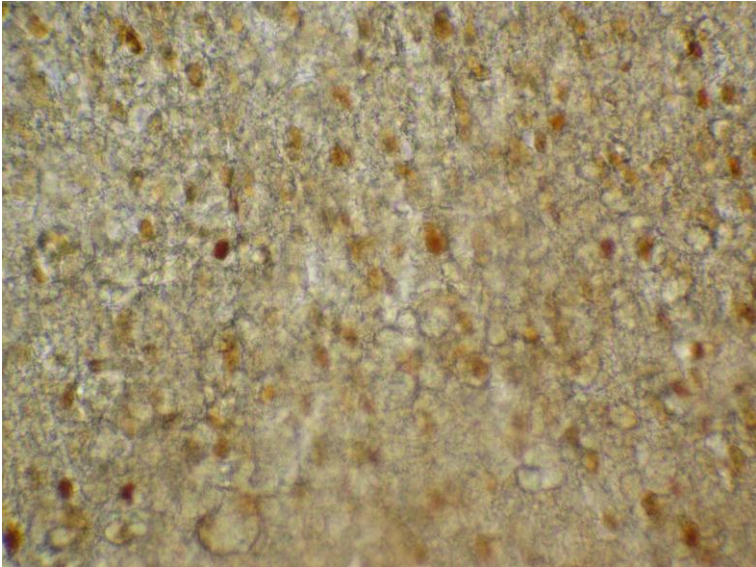
**Corteza Cingulada, área 2 (DOL)**



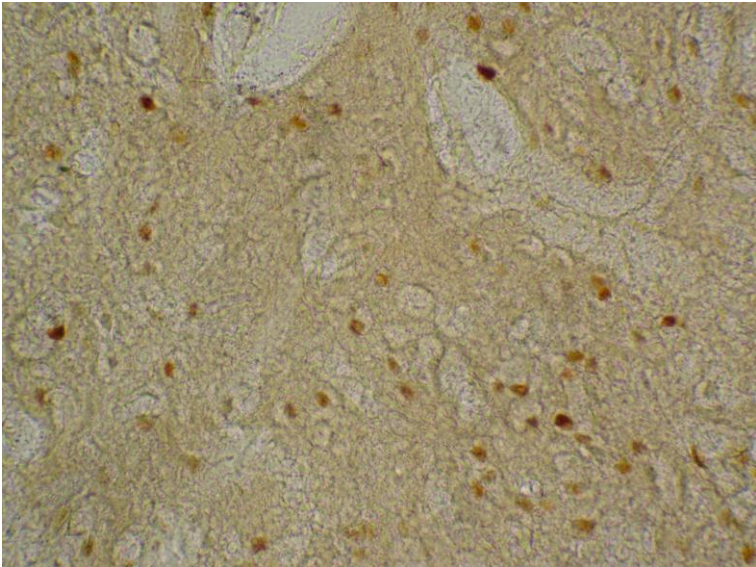
**Corteza Motora Primaria (DOL)**



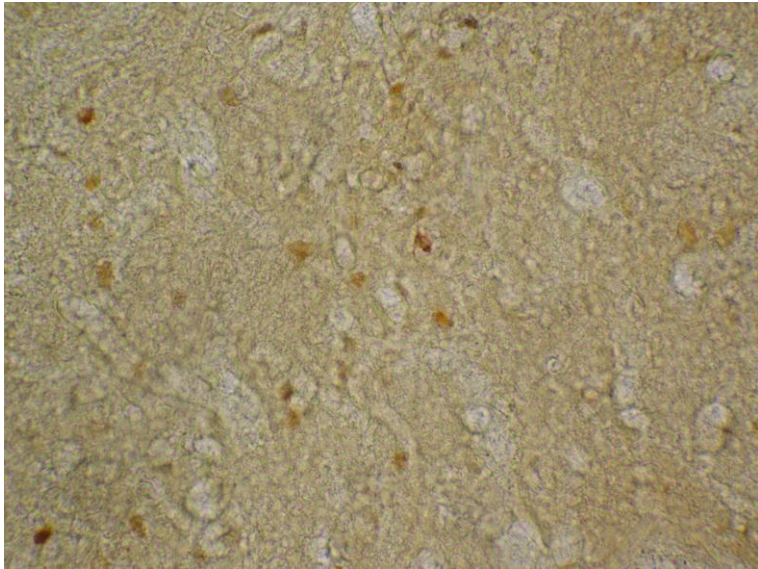
**Corteza Motora Secundaria (DOL)**



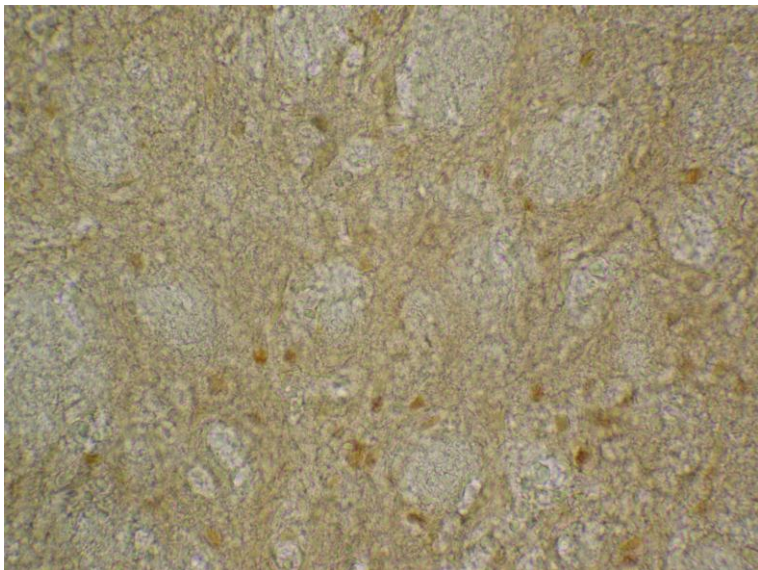
**Núcleo Accumbens, núcleo (SLL)**



**Núcleo Accumbens, corteza (SLL)**



**Putamen caudado (SLL)**



**Núcleo Septo Hipocampal (SLL)**

