

**AVANCES EN LA BÚSQUEDA DE INDICADORES DE MAGNITUD DE
IMPACTO EMOCIONAL SOBRE EL DESEMPEÑO MNEMÓNICO EN RATAS
EXPUESTAS AL LCE: PAPEL DE LA GLICEMIA Y DE DIFERENTES
CRITERIOS DE APRENDIZAJE**

JOHANNA CELEDON JARAMILLO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2010**

**AVANCES EN LA BÚSQUEDA DE INDICADORES DE MAGNITUD DE
IMPACTO EMOCIONAL SOBRE EL DESEMPEÑO MNEMÓNICO EN RATAS
EXPUESTAS AL LCE: PAPEL DE LA GLICEMIA Y DE DIFERENTES
CRITERIOS DE APRENDIZAJE**

JOHANNA CELEDON JARAMILLO

**Proyecto presentado como requisito para obtener el título de
Maestra en Ciencias Básicas Biomédicas, énfasis en Neurociencias**

Director

CARLOS ARTURO CONDE COTES, MD, PhD.

Profesor Titular

Facultad de Salud

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2010

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a las personas más importantes en mi vida, mi madre, mis hermanos, mis sobrinos y a quien desde hace seis años es la razón de mi vida, mi esposo Ronald.

AGRADECIMIENTOS

Doy mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que, de una forma u otra, me ayudaron en el desarrollo de este trabajo.

A mi director de tesis Dr. Carlos Conde Cotes, por la oportunidad de llevar a cabo mi formación en investigación, por la paciencia y comprensión en todo este proceso.

Al Grupo de Investigación en Neurociencias y Comportamiento UIS-UPB, en especial a Jesús Rodríguez y Javier Nieto, por su apoyo en la realización de la fase experimental.

Al Laboratorio de Síntesis Orgánica de la UIS, en especial a su director Dr. Alirio Palma Rodríguez, por el voto de confianza en la realización de los experimentos, aprendí mucho en todo ese proceso.

A mi madre Eucaris, por darme la vida, por la dedicación, apoyo y amor en todas las etapas de mi vida.

A mis hermanos Luz Darys, Victor Manuel y Erwin Antonio. A mis sobrinos Julieth, Víctor Daniel, Carroll, Aura María y María Camila.

Y en especial quiero dar las gracias a mi esposo, mi amigo, mi amor, por todo su apoyo y comprensión, por emprender su proyecto de vida a mi lado. Gracias por tu amor incondicional.

Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología (COLCIENCIAS), por el apoyo financiero en mi formación académica durante estos años.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	20
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GENERAL	24
2.1.1. Primera fase:	24
2.1.2. Segunda fase:	25
2.1.2. Tercera fase:	25
3. MARCO TEORICO	26
3.1 PRIMERA FASE: RELACIÓN ENTRE INDICADORES DE IMPACTO EMOCIONAL Y MEMORIA	26
3.1.1 Memoria	26
3.1.2. Emoción	28
3.1.3 Memoria Emocional	29
3.1.4. Estrés, Glucosa Y Memoria	32
3.1.5 Herramientas para el Estudio de los Efectos del Estrés en los Procesos de Aprendizaje y Memoria en Modelos Animales	34
3.2 SEGUNDA FASE: RELACIÓN ENTRE CONSUMO DE OXIGENO, HORARIO DEL DIA Y SEXO, Y COMPORTAMIENTO EN EL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO	38
3.2.1. Uso del Consumo de Oxígeno como Indicador de Impacto Emocional en Animales de Experimentación	38
3.3. TERCERA FASE: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TIPO ANSIOLITICO DE NUEVOS COMPUESTOS HETEROCICLICOS EN RATAS EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO.	40

3.3.1 Ansiedad	40
3.3.2 Bases Etologicas de los Trastornos de Ansiedad	42
3.3.3 Mecanismo de Acción de las Benzodiazepinas	46
3.3.4. Compuestos Heterociclicos y Ansiedad	47
3.3.5. Uso del Laberinto en Cruz Elevado en la Evaluación de Compuestos Ansiolíticos	48
4. MATERIALES Y METODOS	51
4.1 DISEÑO	51
4.2 CONDICIONES GENERALES DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	51
4.3 CONDICIONES GENERALES DEL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO	52
4.4 MANIPULACION Y PESAJE DE LOS ANIMALES	54
4.5 PROCEDIMIENTOS DETALLADOS	55
4.5.1 Fase 1. Aplicación de Criterio de Aprendizaje y Medicion de Niveles de Glucosa en Ratas Wistar-Uis Expuestas al Lce	55
4.5.1.1 Animales	55
4.5.1.2 Farmacos Y Reactivos:	55
4.5.1.3 Procedimientos	55
4.5.1.4 Variables Evaluadas	57
4.5.1.5 Análisis Estadístico	58
4.5.2 Fase 2. Relación entre Consumo de Oxigeno, Horario del Dia, Sexo, y Comportamiento en el LCE	59
4.5.2.1 Fase 2.1: Consumo de Oxigeno por Horario y Sexo en Ratas Wistar-UIS	59
4.5.2.1.1 Animales	59
4.5.2.1.2 Consumo de Oxigeno	59
4.5.2.1.3 Farmacos y Reactivos	60
4.5.2.1.4 Procedimientos	60
4.5.2.1.5 Variables Evaluadas:	61

4.5.2.1.6 Análisis Estadístico	61
4.5.2.2 Fase 2.2: Correlación entre Consumo de Oxígeno Basal y Post- Aplicación de Adrenalina con Manifestaciones Comportamentales de Ansiedad y Desempeño Mnemónico	62
4.5.2.2.1 Animales:	62
4.5.2.2.2 Farmacos Y Reactivos:	62
4.5.2.2.3 Procedimientos:	62
4.5.2.2.4 Variables Evaluadas:	62
4.5.2.2.5 Análisis Estadístico:	63
4.5.3 Fase 3. Evaluación de Efectos de Tipo Ansiolítico de 1,4-Epoxi-2-Arilo(2- Estiril)Tetrahidro-1-Benzodiazepinas En Ratas Expuestas Al LCE	63
4.5.3.1 Animales:	63
4.5.3.2 Farmacos y Reactivos.	63
4.5.3.3 Síntesis de las Nuevas Moléculas	64
4.5.3.4 Procedimientos:	65
4.5.3.5 Análisis Estadístico:	66
4.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS	67
5. RESULTADOS	68
5.1 FASE 1. IMPACTO DE LOS CRITERIOS DE APRENDIZAJE SOBRE LOS COMPORTAMIENTOS INDICADORES DE ANSIEDAD Y EL DESEMPEÑO MNEMONICO DE RATAS WISTAR-UIS	68
5.1.1 Duración Sesión uno (T Sesión Uno)	68
5.1.2 Porcentaje de Entradas a Brazo Abierto (%EBA)	69
5.1.3 Porcentaje de Tiempo en Brazo Abierto (%TBA)	70
5.1.4 Latencia De Salida A Brazo Abierto (LAT SALIDA)	72
5.1.5 Cruzamientos	73
5.1.6 Resultados Asociados a Lugares Discretos del Laberinto	74
5.1.7 Evolución Temporal De Las Variables Comportamentales Evaluadas	81

5.1.8 Impacto de los Criterios de Aprendizaje Sobre los Niveles de Glicemia de Ratas Wistar-UIS	88
5.1.9 Correlación entre Manifestaciones Comportamentales de Ansiedad y Niveles de Glicemia	89
5.1.10 Fase 2.1 Consumo De Oxígeno Por Horario Y Sexo En Ratas WISTAR-UIS	92
5.1.11 Fase 2.2 Correlación entre Consumo de Oxígeno Basal y Post-Aplicación de Adrenalina y Manifestaciones Comportamentales de Ansiedad	94
5.2 FASE 3: EVALUACION DE EFECTOS DE TIPO ANSIOLITICO DE 1,4-EPOXI-2-ARIL(2-ESTIRIL) Y <i>cis</i> -2-(1'-NAFTIL)-4-HIDROXITETRAHIDRO-1-BENZOAZEPINAS EN RATAS EXPUESTAS AL LCE	97
5.2.1 Molécula CAR24R	97
5.2.2 Molécula LIA3M12	98
5.2.3 Molécula SAM159C2	99
6. DISCUSION	103
6.1 FASE 1. IMPACTO DE LOS CRITERIOS DE APRENDIZAJE SOBRE LOS COMPORTAMIENTOS INDICADORES DE ANSIEDAD Y EL DESEMPEÑO MNEMONICO DE RATAS WISTAR-UIS	103
6.1.1 Impacto sobre Comportamientos Indicadores de Ansiedad y Desempeño MNEMONICO	103
6.1.2 Impacto sobre los Niveles de Glicemia	106
6.2.1 Fase 2.1 Consumo de Oxígeno Por Horario y Sexo en Ratas WISTAR-UIS	110
6.2.2 Fase 2.2 Correlación entre Consumo de Oxígeno Basal y Post-Aplicación de Adrenalina y Manifestaciones Comportamentales de Ansiedad	113

6.3 FASE 3: EVALUACION DE EFECTOS DE TIPO ANSIOLITICO DE 1,4-EPOXI-2-ARIL(2-ESTIRIL) Y cis-2-(1'-NAFTIL)-4-HIDROXITETRAHIDRO-1-BENZOAZEPINAS EN RATAS EXPUESTAS AL LCE	117
7. CONCLUSIONES	121
8. PERSPECTIVAS	123
9. REFERENCIAS	125

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clasificación de la memoria	27
Figura 2. Estructura de las benzodiazepinas	46
Figura 3. Estructura química general de las benzodiazepinas y de las tres nuevas moléculas evaluadas	48
Figura 4. Fotografía del Laberinto en Cruz Elevado	53
Figura 5. Esquema del LCE con sus dimensiones	53
Figura 6. División virtual del LCE	54
Figura 7. Diseño experimental fase 1	57
Figura 8. Cámara para registro de Consumo de Oxígeno para animales pequeños	60
Figura 9. Síntesis de las moléculas SAM159C2, CAR24R, LIA3M12	65
Figura 10. Comparación de la duración sesión uno de acuerdo a tratamiento y criterio de aprendizaje	69
Figura 11. Comparación entradas relativas a brazo abierto de acuerdo a tratamiento, criterio de aprendizaje y sesión experimental	70
Figura 12. Comparación del tiempo relativo en brazo abierto de acuerdo a tratamiento, criterio de aprendizaje y sesión experimental	71
Figura 13. Comparación de la latencia de salida a brazo abierto de acuerdo a tratamiento, criterio de aprendizaje y sesión experimental	72
Figura 14. Comparación del número de cruzamientos de acuerdo a tratamiento, criterio de aprendizaje y sesión experimental	74
Figura 15. Comparación del tiempo relativo en los lugares 1, 3 (brazo cerrado); 4 (centro); 5,6 y 7 (brazo abierto) de acuerdo a tratamiento y criterio de aprendizaje en sesión uno	76

Figura 16. Comparación de entradas relativas a los lugares 1, 3 (brazo cerrado); 4 (centro); 5, 6 y 7 (brazo abierto) de acuerdo a tratamiento y criterio de aprendizaje en sesión uno	78
Figura 17. Comparación del tiempo relativo en los lugares 1, 3 (brazo cerrado); 4 (centro); 5,6 y 7 (brazo abierto) de acuerdo a tratamiento y criterio de aprendizaje en sesión dos	79
Figura 18. Comparación de las entradas relativas a los lugares 1, 3 (brazo cerrado); 4 (centro); 5, 6 y 7 (brazo abierto) de acuerdo a tratamiento y criterio de aprendizaje en sesión dos	80
Figura 19. Evolución de las entradas acumuladas en el tiempo en los lugares 1, 4 y 7 durante la primera y segunda sesión de las ratas con criterio 1min tratadas con solución salina normal o diazepam	82
Figura 20. Evolución del tiempo acumulado en los lugares 1, 4 y 7 durante la primera y segunda sesión de las ratas con criterio 1min tratadas con solución salina normal o diazepam	83
Figura 21. Evolución de las entradas acumuladas en el tiempo en los lugares 1, 4 y 7 durante la primera y segunda sesión de las ratas con criterio 3min tratadas con solución salina normal o diazepam	84
Figura 22. Evolución del tiempo acumulado en los lugares 1, 4 y 7 durante primera y segunda sesión de ratas con criterio 3min tratadas con solución salina normal o diazepam	85
Figura 23. Evolución de las entradas acumuladas en el tiempo en los lugares 1, 4 y 7 durante primera y segunda sesión de ratas con criterio 5min tratadas con solución salina normal o diazepam	86
Figura 24. Evolución del tiempo acumulado en los lugares 1, 4 y 7 durante primera y segunda sesión de ratas con criterio 5min tratadas con solución salina normal o diazepam	87
Figura 25. Comparación de los niveles de glicemia (mg/dL) post-sesiones de acuerdo a criterio de aprendizaje y tratamiento	88

Figura 26. Comparación del consumo de oxígeno de acuerdo a sexo y horario de evaluación	92
Figura 27. Consumo de oxígeno de acuerdo al sexo y horario	93
Figura 28. Porcentaje de tiempo en brazo abierto durante primera y segunda sesión de ratas expuestas a las diferentes moléculas	100
Figura 29. Porcentaje de entradas a brazo abierto durante primera y segunda sesión de ratas expuestas a las diferentes moléculas	101
Figura 30. Número de cruzamientos observados durante la primera y segunda sesión de ratas expuestas a diferentes moléculas	102

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Relación entre estrategias defensivas y trastornos de ansiedad en humanos	45
Tabla 2. Distribución de animales según género y horario	59
Tabla 3. Coeficientes de correlación entre los niveles de glicemia post sesión 1 y las variables comportamentales de la sesión 1 en el LCE de acuerdo al criterio y tratamiento utilizados	90
Tabla 4. Coeficientes de correlación entre los niveles de glicemia post sesión 1 y las variables comportamentales de la sesión 2 en el LCE de acuerdo al criterio y tratamiento utilizados	91
Tabla 5. Coeficientes de correlación entre el consumo de oxígeno (VO_2) y variables comportamentales de la sesión uno en el LCE	95
Tabla 6. Coeficientes de correlación entre el consumo de oxígeno (VO_2) y variables comportamentales de la sesión dos en el LCE	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
ATPS	Condiciones ambientales de temperatura y presión
BA	Brazo abierto del laberinto en cruz elevado
BC	Brazo cerrado del laberinto en cruz elevado
CAR24R	7-metil- <i>cis</i> -4-hidroxi-2-(1'-naftil)tetrahidro-1-benzoazepina
Cm	Centímetros
CO₂	Dióxido de carbono
DZP	Diazepam
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GABA-AR	Receptor de la sub-unidad alfa del GABA
IP	Intraperitoneal
LAT SALIDA	Latencia de salida a brazo abierto del laberinto en cruz elevado
LCE	Laberinto en cruz elevado
LIA3M12	7-flúoro-2- <i>exo</i> -(<i>trans</i> -estiril)-1,4-epoxitetrahidro-1-benzoazepina
Min	Minutos
PTZ	Pentilentetrazol
SAM159C2	7-bromo-2- <i>exo</i> -fenil-1,4-epoxitetrahidro-1-benzoazepina
Seg	Segundos
SSN	Solución salina normal
STPD	Condiciones estándar de temperatura y presión del gas seco
TAG	Trastorno de ansiedad generalizada
VO₂	Consumo de oxígeno
%EBA	Porcentaje de entradas a brazo abierto
%EBC	Porcentaje de entradas a brazo cerrado
%EC	Porcentaje de entradas al centro del laberinto
%TBA	Porcentaje de tiempo de permanencia en brazo abierto
%TBC	Porcentaje de tiempo de permanencia en brazo cerrado

RESUMEN

TÍTULO* AVANCES EN LA BUSQUEDA DE INDICADORES DE MAGNITUD DE IMPACTO EMOCIONAL SOBRE EL DESEMPEÑO MNEMONICO EN RATAS EXPUESTAS AL LCE: PAPEL DE LA GLICEMIA Y DE DIFERENTES CRITERIOS DE APRENDIZAJE

AUTORES: CELEDÓN, J. y CONDE, C.**

PALABRAS CLAVE: LABERINTO EN CRUZ ELEVADO, BENZODIAZEPINAS, GLICEMIA, MEMORIA EMOCIONAL, CONSUMO DE OXÍGENO, REACTIVIDAD EMOCIONAL

El objetivo del estudio fue evaluar indicadores fisiológicos de reactividad emocional y su relación con el comportamiento y memoria de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado (LCE). Se implementó un criterio de aprendizaje, basado en diferentes tiempos de permanencia de los animales en los brazos cerrados del LCE (1, 3 ó 5 min). En una primera fase, 60 ratas Wistar-UIS fueron distribuidas en los tres criterios evaluados y dos grupos de tratamiento [Solución Salina Normal (SSN) vs Diazepam (DZP)] y les fue tomada una muestra de glicemia antes y después de la primera y segunda sesión del LCE. En el grupo de SSN-5min se observó una correlación negativa entre la glicemia y los porcentajes de tiempo de permanencia (%TBA) y número de entradas a brazos abiertos (%EBA), indicando que la glicemia puede ser un marcador de reactividad y aprendizaje emocional adecuado en estos animales. Una segunda fase evaluó en 10 ratas la correlación entre el nivel de consumo de oxígeno basal con las variables comportamentales durante una primera y segunda sesión del LCE. Se encontró una correlación positiva entre el consumo de oxígeno basal y el %EBA y %TBA en primera y segunda sesión del LCE, indicando que es posible su utilización en la identificación de ratas con una mayor reactividad emocional. Por último, en una tercera fase de experimentación se evaluaron las propiedades ansiolíticas de tres nuevas moléculas derivadas de la tetrahydro-1-benzoazepina (CAR24R, LIA3M12 y SAM159C2) en 103 ratas Wistar-UIS expuestas al LCE, encontrándose que la molécula CAR24R incrementó el %EBA y %TBA en comparación con SSN, lo que sugiere propiedades ansiolíticas asociadas a esta molécula y garantiza la realización de futuros estudios para determinar su potencial como medicamento ansiolítico en humanos.

* Tesis de maestría

** Facultad de salud. Maestría Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Carlos Arturo Conde Cotes.

ABSTRACT

TÍTULO* ADVANCES IN THE SEARCH OF INDICATORS OF EMOTIONAL IMPACT ON THE MNEMONIC PERFORMANCE OF RATS EXPOSED TO THE ELEVATED PLUS MAZE: ROLE OF GLYCEMIA AND DIFERENT LEARNING CRITERIA

AUTHORS: CELEDÓN, J. and CONDE, C.**

KEY WORDS: ELEVATED PLUS MAZE, BENZODIAZEPINES, GLYCEMIA, EMOTIONAL MEMORY, OXYGEN CONSUMPTION, EMOTIONAL REACTIVITY

The aim of the study was to assess physiological markers of emotional reactivity and their relationship with behavior and memory of rats exposed to the elevated plus maze (EPM). A learning approach based on different residence times of animals in the closed arms of the EPM (1, 3 or 5 min) was implemented. In a first phase, 60 Wistar UIS rats were distributed in the three criteria evaluated and two treatment groups (Saline vs Diazepam) and it was taken a sample of blood glucose before and after the first and second sessions of the EPM. In the group of rats with saline and 5min criterion it was observed a negative correlation between glucose levels and the percentage of time spent and number of entries to open arms, indicating that glucose could be a marker of emotional reactivity and learning in these animals. A second phase of testing evaluated in 10 Wistar-UIS rats the correlation between the level of oxygen consumption with the behavioral variables during the first and second sessions of the EPM. We found a positive correlation between these variables, indicating a possible use of this marker in the identification of rats with increased emotional reactivity. In the third phase of testing, we evaluated the anxiolytic properties of three new molecules derived from the tetrahydro-1-benzoazepine (CAR24R, LIA3M12 and SAM159C2) in 109 Wistar-UIS rats exposed to the EPM. It was found that the molecule CAR24R increased the percentage of time spent and number of entries to open arms in comparison with saline, suggesting anxiolytic properties associated with this molecule and ensuring future studies aimed at determining its potential as anti-anxiety medication in humans.

* MSc. Thesis

** Health Faculty, Medicine School, Biomedical Basic Sciences Master Program. Tutor: Carlos Arturo Conde Cotes

1. INTRODUCCIÓN

El trastorno de ansiedad generalizada es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (Fricchione 2004, Lieb et al 2005). En Colombia, el estudio nacional de salud mental del año 2003 (estudio nacional de salud mental-Colombia 2003) evidenció que los trastornos de ansiedad son las enfermedades de salud mental con mayor prevalencia en nuestra población. Adicionalmente, esta patología es responsable de altos costos directos e indirectos para el sistema de salud, debido a la utilización de servicios de atención primaria, las visitas a especialistas, hospitalizaciones y disminución en la productividad (Albarracín et al 2008).

Debido a su relevancia, diferentes áreas del conocimiento han confluído para el estudio de esta patología. Una de ellas ha sido la etología, que es la ciencia encargada del estudio del comportamiento de los animales en condiciones que asemejen el comportamiento en su hábitat natural. En análisis experimentales del comportamiento defensivo, se han identificado estrategias de defensa que son compartidas por diferentes especies; dentro de éstas encontramos a la exploración prudente del medio ambiente, es decir, la evaluación del riesgo que se presenta en roedores, la cual puede ser comparada con manifestaciones comportamentales generadas ante determinadas situaciones de estrés en humanos (Blanchard & Blanchard 1988, Shuhama et al 2007). Este enfoque ha permitido el estudio de los componentes biológicos determinantes de los trastornos de ansiedad y su aplicación en el área de la psicofarmacología.

Una herramienta etológicamente derivada es el laberinto en cruz elevado (LCE), el cual ha sido validado desde los puntos de vista: farmacológico, comportamental y fisiológico (Pellow et al 1985). Su utilidad radica en permitir el estudio de

comportamientos generados por situaciones percibidas como aversivas por algunos roedores, como los espacios abiertos o nuevos y las alturas (Pellow et al 1985, Rodgers & Dalvi 1997, Holmes & Rodgers 1998).

Con el objetivo de contribuir a la comprensión de los mecanismos relacionados con el comportamiento de la rata en el LCE, como un modelo espontáneo de memoria emocional relacionado con sistemas aversivos, el Grupo de Investigación en Neurociencias y Comportamiento UIS-UPB, ha estudiado diversos factores relacionados con la primera experiencia del animal en el laberinto, y sus respuestas tanto comportamentales como fisiológicas (Conde et al 1999, Báez et al 2001, Conde et al 2001a, Conde et al 2001b, Uribe et al 2002).

Un aspecto de particular importancia ha sido el estudio de la relación entre la intensidad de los estímulos aversivos y las respuestas comportamentales de las ratas, relacionadas con los procesos de adquisición y retención de memoria emocional. El proceso de aprendizaje de la rata en el LCE se fundamenta en la exposición del animal a dos ambientes diferentes, el aversivo generado por los brazos abiertos y el virtualmente seguro representado por los brazos cerrados (Bertoglio & Carobrez 2000, Carobrez & Bertoglio 2005). La implementación de criterios de aprendizaje, basados en diferentes tiempos de permanencia fuera de los brazos abiertos puede permitir la manipulación de la cantidad de información aversiva recibida por las ratas, y consecuentemente la determinación de su impacto sobre los procesos comportamentales y fisiológicos ocurridos durante la adquisición y consolidación de la memoria emocional (Tomaz et al 2003).

Múltiples estudios han explorado diversos indicadores comportamentales y fisiológicos del impacto emocional que produce la exposición de las ratas a situaciones aversivas durante la exposición al LCE. Algunas de las variables exploradas han mostrado relación con el desempeño mnemónico de estos animales (Báez et al 2001, Conde et al 2001b, Uribe et al 2002, Velásquez et al

2009), sin embargo, las asociaciones aunque significativas han mostrado ser relativamente débiles (Conde et al 2001b, Uribe et al 2002, Velásquez et al 2009). En ese sentido, aún persiste la duda sobre cual aspecto de la vivencia del animal en el LCE puede ser realmente destacado para caracterizar tanto su comportamiento en primera sesión, como su desempeño mnemónico en sesiones posteriores.

Previamente se ha descrito una relación significativa entre los niveles de glucosa circulante (glicemia) y la memoria, tanto en humanos (Maning et al 1993) como en roedores (McNay & Gold 2002, Messier 2004, Gold 2005) y se ha planteado la hipótesis según la cual, el incremento en los niveles de glicemia podría ser un paso intermedio entre la liberación periférica de adrenalina, en respuesta a situaciones con alto contenido emocional y la modulación central de los procesos mnemónicos (Gold 2005). En modelos animales se ha estudiado la relación entre los niveles de glicemia y la memoria en diferentes pruebas como la exposición una descarga eléctrica plantar (*foot-shock*) (Malin & McGaugh 2006) y la prueba de nado forzado (*Forced swimming test*) (Armario et al 1991, Jefferys & Funder 1991). Sin embargo, existen pocos reportes en la literatura acerca de abordajes tendientes a evaluar otros posibles efectos de la glucosa, dentro del mismo contexto de la memoria, frente a situaciones de estrés inducido por la exposición al LCE. Otro marcador fisiológico que podría tener utilidad en la evaluación de la reactividad emocional de ratas expuestas al LCE es el consumo de oxígeno. Este parámetro permite determinar la tasa metabólica de un organismo, y es utilizado para evaluar el estado funcional y su relación con diversos procesos metabólicos (Ball & Jungas 1961, Bramante 1961, Torres et al 2008). El presente estudio pretende evaluar la glicemia y el consumo de oxígeno como indicadores fisiológicos de estrés y su relación con variables comportamentales y desempeño mnemónico de ratas expuestas al LCE.

Por último, a pesar de que han sido desarrollados compuestos relativamente efectivos para el tratamiento de los trastornos de ansiedad como las benzodiazepinas, éstas pueden producir efectos negativos tales como déficit cognitivo, alteraciones de la coordinación motora, amnesia anterógrada, tolerancia y dependencia (Heninger et al 1990, Nutt 2005). Es por esto que el desarrollo de medicamentos con acción terapéutica similar, pero sin el perfil de efectos indeseables asociados a las benzodiazepinas, es un área de gran interés en la psicofarmacología actual. Debido a esto, en el presente trabajo se evalúan las propiedades ansiolíticas de nuevos compuestos derivados de la tetrahydro-1-benzoazepina, así como su papel en el desempeño mnemónico de ratas expuestas al LCE.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del estudio fue la evaluación de indicadores comportamentales y fisiológicos de reactividad emocional, y su relación con los procesos de aprendizaje y memoria en ratas expuestas al LCE.

Para el logro de este objetivo fueron desarrolladas tres fases experimentales en las cuales se realizaron intervenciones comportamentales y farmacológicas dirigidas a manipular la intensidad y duración de los estímulos aversivos de una manera controlada. Los objetivos específicos que se pretendieron alcanzar fueron los siguientes:

2.1.1. Primera fase:

- Determinar el impacto de criterios de aprendizaje relacionados con diferentes tiempos de permanencia continua fuera de los brazos abiertos del LCE, sobre los comportamientos indicadores de ansiedad, los niveles de glicemia post-exposición y el desempeño mnemónico de ratas Wistar-UIS
- Evaluar la existencia de correlación entre las manifestaciones comportamentales de ansiedad y los niveles de glicemia post-exposición al LCE
- Realizar la descripción de la evolución temporal de las variables comportamentales evaluadas y su efecto sobre los procesos de adquisición y retención de memoria emocional de ratas Wistar-UIS expuestas al LCE

- Determinar el efecto de la aplicación de diazepam intraperitoneal en los indicadores de reactividad emocional y desempeño mnemónico de ratas Wistar-UIS sometidas a tres criterios de aprendizaje relacionados con diferentes tiempos de permanencia continua fuera de los brazos abiertos del LCE

2.1.2. Segunda fase:

- Establecer si existen diferencias en los niveles de consumo de oxígeno de acuerdo al sexo o momento de medición durante el ciclo claro en ratas Wistar-UIS
- Determinar si existe correlación entre los niveles de consumo de oxígeno pre y post-aplicación de adrenalina intraperitoneal y los indicadores comportamentales de reactividad emocional y desempeño emocional en ratas Wistar-UIS expuestas al LCE

2.1.2. Tercera fase:

- Evaluar los efectos de tipo ansiolítico de tres nuevas moléculas derivadas de la tetrahydro-1-benzoazepina, mediante el análisis de indicadores comportamentales de reactividad emocional en ratas Wistar-UIS expuestas al LCE
- Determinar los efectos de las moléculas desarrolladas sobre los procesos de adquisición y retención de memoria emocional de ratas Wistar-UIS expuestas al LCE

3. MARCO TEORICO

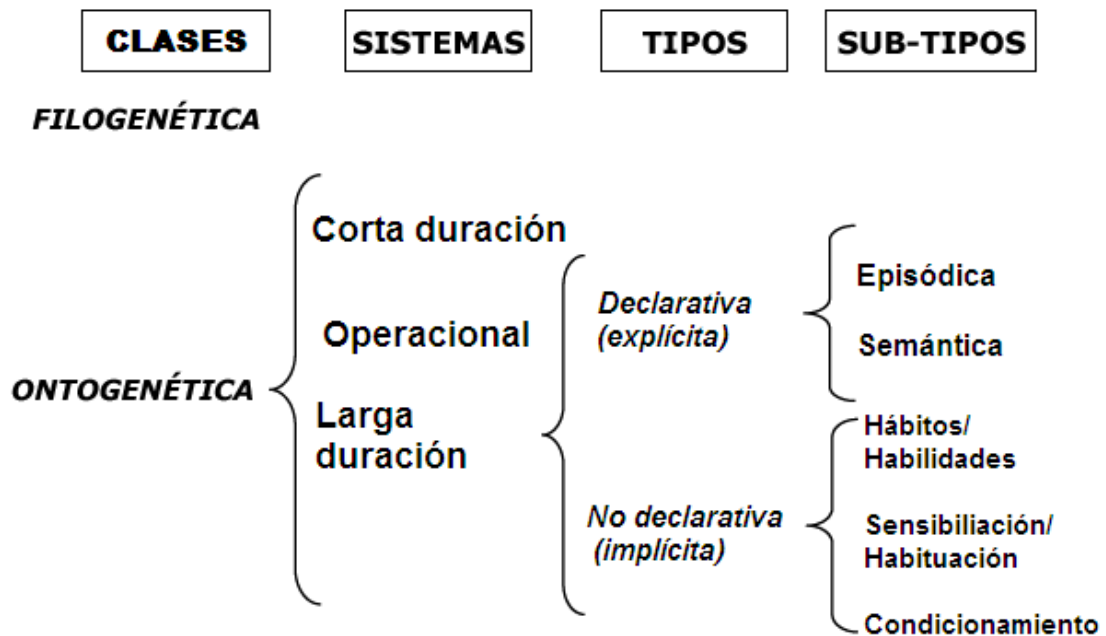
3.1 PRIMERA FASE: RELACIÓN ENTRE INDICADORES DE IMPACTO EMOCIONAL Y MEMORIA

3.1.1 Memoria

La memoria es vista como la capacidad de los seres vivos de adquirir, retener y utilizar información, fenómeno complejo que se presenta a partir de substratos neurofisiológicos, así como factores de tipo motivacional o de inhibición, tanto internos como externos (Milner et al 1998, Frank & Tomaz 2000). A partir de análisis etológicos y neurobiológicos del comportamiento, se considera la existencia de dos clases de memoria. Una llamada filogenética, propia o específica de cada especie y que es transmitida genéticamente de generación en generación; y otra llamada memoria ontogenética, la cual es adquirida por medio de procesos de aprendizaje dependientes de la experiencia del individuo, sin ser transmitida genéticamente entre generaciones (Tomaz & Costa 2000). Dentro de la memoria ontogénica, se encuentran diferentes sistemas; la memoria de corta duración, cuando la información se mantiene disponible por un periodo de tiempo limitado, generalmente corto, y la memoria de larga duración, cuando se presenta la transferencia de la información de corto a largo plazo, es decir, se almacena por períodos de tiempo prolongado (Squire 1986, Tomaz et al 1993). La memoria de larga duración, puede a su vez, ser sub-dividida en dos tipos, explícita o declarativa e implícita o no declarativa (Graf & Schacter 1985), refiriéndose la explícita al aprendizaje sobre personas, lugares y acontecimientos que pueden relatarse verbalmente, o como su nombre lo indica, manifestarse explícitamente de forma no verbal; lo cual requiere de un alto nivel de conciencia de la información. Por otro lado, la memoria implícita incluye formas de aprendizaje

perceptivo y motor y a diferencia de la explícita, no requiere de un alto nivel de consciencia, pero sí de atención; este tipo de memoria es adquirida gradualmente y mejora con la práctica (ejemplo: condicionamiento, habituación) (Graf & Schacter 1985, Schacter 1987, Schacter & Cooper 1993) (Figura 1).

Figura 1. Clasificación de la memoria. Adaptado de Tomaz & Costa (2000)



FASES O ESTADÍOS DE LA MEMORIA

ADQUISICIÓN/CODIFICACIÓN

Se refiere a la entrada de la información de un evento a través de los sistemas sensoriales (auditivo, gustativo, olfativo, visión, tacto). Esta información es transformada en un código neural por las áreas corticales y subcorticales, en un sistema de memoria a corto plazo, proceso conocido como codificación.

CONSOLIDACIÓN

Cuando un evento puede ser memorizado por un periodo de tiempo prolongado, se dice que ocurre un proceso de consolidación, el cual consiste en la

transferencia de la información de corto a largo plazo. Esta fase de la memoria puede ser fácilmente modulada por mecanismos físicos, químicos o cognitivos.

EVOCACIÓN

Se refiere a la recuperación de la información que fue previamente almacenada en los sistemas neurales.

3.1.2. Emoción

No existe un consenso en la comunidad científica acerca de lo que es la emoción, no obstante, podría considerarse como el resultado de la activación neural que incluye un componente perceptual subjetivo, acompañado de reacciones psicomotoras y neurovegetativas, que se producen como respuesta ante determinados estímulos (Ledoux 1993, Ledoux 1995, Conde et al 2001b). Debido a la complejidad que presenta dar un concepto de lo que es emoción, se han construido diferentes teorías que tratan de explicar su origen. Dentro de éstas las más conocidas y en cierta forma, aceptadas son las siguientes:

- Teoría de James-Lange (origen periférico de las emociones): esta teoría fue propuesta por William James, filósofo americano, y Carl Lange, psicólogo danés, y relaciona los eventos fisiológicos con los estados emocionales. De acuerdo a esta teoría, la emoción no es más que la percepción de las alteraciones fisiológicas desencadenadas por el estímulo emocional. Estos autores propusieron que la corteza cerebral recibe e interpreta los estímulos sensoriales que provocan emoción, produciendo a su vez, cambios en los órganos viscerales a través del sistema nervioso autónomo, y en los músculos a través del sistema nervioso somático. Básicamente, esta teoría propone que la reacción fisiológica ante el estímulo es lo que provoca la emoción (Friedman 2009).

- Teoría de Cannon y Bard (origen central de las emociones): esta teoría formulada por Walter B. Cannon y Phillip Bard, plantea que el origen de las expresiones emocionales es el sistema nervioso central, donde se origina y procesa la experiencia emocional y luego es traducida en las respuestas autonómicas, entre otras manifestaciones. Esta teoría argumenta que la retroalimentación autonómica (feedback) no es necesaria para experimentar las emociones; sino que los sentimientos y las respuestas fisiológicas son componentes independientes de la emoción, procesados de manera separada y simultánea en el cerebro, generando tanto la respuesta somática como los sentimientos (Friedman 2009).

Existe un aspecto en el que la mayoría de investigadores en el área de la emoción concuerdan, la relación entre emoción y motivación, esta última puede ser definida como un proceso neural que lleva al organismo a realizar alguna acción o a alcanzar un objetivo en particular, lo que produce como resultado, ya sea un incremento o una reducción del impulso emocional; tomando en consideración que la emoción se presenta como consecuencia de un comportamiento motivado, debido a la obtención o no del objetivo deseado.

3.1.3 Memoria Emocional

La memoria a largo plazo para un evento determinado puede ser potenciada o reducida por manipulaciones llevadas a cabo poco tiempo después del aprendizaje. En investigaciones realizadas en animales expuestos a electrochoques (Malin & Mcgaugh 2006) o estimulación con medicamentos (Cain et al 2005), se encontró que los eventos con alto contenido emocional son recordados más claramente y por más tiempo, mientras que aquellos con contenido neutro, es decir, libres de contenido emocional, eran olvidados más fácilmente. Estos resultados permitieron el planteamiento de una hipótesis, según la cual, el contenido emocional de estos eventos podría estar potenciando un

mecanismo de regulación de la consolidación de la memoria. Se le denomina memoria emocional a procesos de adquisición, consolidación y evocación de estados emocionales asociados a experiencias del individuo, los cuales pueden ser evaluados tanto en humanos como en animales (Mcgaugh et al 1975, Conde et al 2001a).

La memoria de eventos emocionales posee una cualidad especial, que la torna más resistente al olvido y que está asociada a los mecanismos de defensa y supervivencia (Labar & Cabeza 2006). Ha sido demostrado que el alertamiento emocional influencia la retención de la memoria declarativa a largo plazo, y que el mecanismo subyacente a este fenómeno es un aumento del estado de activación fisiológico y cognitivo, causado por el estímulo (Cahill et al 1994). Las características particulares de un evento emocional tienden a ser recordadas con mayor o menor facilidad, dependiendo del nivel de alertamiento, el cual se relaciona con la intensidad de la experiencia, abarcando, desde situaciones totalmente tranquilas, hasta situaciones altamente excitantes o perturbadoras (Conde et al 2001a, Kensinger 2004, Botelho et al 2008a, Botelho et al 2008b, Conde et al 2008).

Diversos estudios han sido realizados para identificar qué partes del cerebro se encuentran involucradas en este fenómeno y qué moléculas median este potenciamiento de los procesos mnemónicos. Se ha identificado a la amígdala, especialmente los núcleos lateral y basolateral, como uno de los órganos principales encargados de esta función (Tomaz et al 1993); y ciertas hormonas de estrés como el cortisol y la noradrenalina, que actúan como moduladoras de este proceso (Mcgaugh et al 1975, Cahill et al 1994, Cahill et al 1995, Cahill et al 1996, Cahill 1998, Mcgaugh 2000).

A nivel del sistema nervioso, la primera respuesta ante una situación con carga emocional es generada por el sistema nervioso simpático. Esta respuesta es

iniciada por el hipotálamo, activando neuronas en la médula espinal, las cuales envían una señal a la médula adrenal. Esto resulta en una rápida liberación de adrenalina y noradrenalina, que conduce a un incremento en la frecuencia cardiaca, en la frecuencia respiratoria y en la sudoración (De Kloet et al 2005). Este sistema hormonal activado por la alerta emocional regula el almacenamiento de la memoria emocional a largo plazo (Cahill & Mcgaugh 1995). Las pruebas directas de esta hipótesis, provienen de estudios realizados con ratas colocadas en compartimentos donde, si pasaban un límite establecido, recibían un choque eléctrico de diferentes intensidades. Estos experimentos encontraron que aquellas ratas que recibieron una dosis de adrenalina adicional al choque eléctrico, presentaban una mayor latencia de salida o evitación en una segunda sesión en comparación con las que recibían solución salina (Gold 1995). A este estudio han seguido otros en los cuales se ha confirmado que la aplicación de adrenalina y sus agonistas, durante la fase de codificación o inmediatamente después de una sesión de entrenamiento en animales, estimula la consolidación de la memoria de una forma dosis-dependiente y por el contrario, la administración de antagonistas β -adrenérgicos lleva a una disminución del desempeño mnemónico (McGaugh, 2004).

Otro tipo de respuesta, más lenta, es la generada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, el cual está envuelto en las respuestas fisiológicas ante el estrés; cuyo resultado final es la síntesis y liberación de glucocorticoides, que pueden atravesar la barrera hematoencefálica. La administración aguda de glucocorticoides, o la liberación endógena de cortisol, inducida por el estrés durante la fase de consolidación, ha mostrado incrementar también los procesos de aprendizaje y memoria emocional (Buchanan & Lovallo 2001, Cahill & Akire 2003). En el cerebro, los glucocorticoides pueden actuar a través de dos receptores intracelulares diferentes (receptores tipo I o mineralocorticoides y tipo II o glucocorticoides) (Joels 2001, Herbert et al 2006), los cuales pueden influenciar la

excitabilidad y plasticidad neural, así como la remodelación dendrítica y la neurogénesis (McEwen 2003, De Kloet et al 2005).

3.1.4. Estrés, Glucosa Y Memoria

El término estrés proviene de la ingeniería, y en el campo biológico puede ser definido como cualquier condición que perturbe el equilibrio dinámico de un organismo, dicha perturbación puede ser de carácter intrínseco o extrínseco. Ante este estímulo, el animal responde mediante adaptaciones tanto comportamentales como fisiológicas, con el fin de compensar y adaptarse a la nueva situación; por tanto, la respuesta aguda al estrés es un mecanismo adaptativo, que capacita al organismo para responder de manera eficaz ante una amenaza potencial o real, y así lograr su supervivencia (Kim & Diamond 2002).

La liberación de adrenalina en respuesta al estrés estimula la liberación de glucosa, a partir de glucógeno hepático a la circulación sistémica (Lehninger 2004). Tal incremento en los niveles de glicemia, permite tener recursos energéticos disponibles para ser utilizados durante una situación de emergencia, especialmente para el incremento de la actividad locomotora. Al inyectar tanto adrenalina como glucosa en ratas, se regulan varias funciones cerebrales, incluyendo la potenciación del aprendizaje y la memoria. Parsons & Gold en 1992, encontraron que la glucosa tenía un efecto dosis-tiempo-dependiente similar al de la adrenalina (en forma de U invertida), siendo más efectivo cuando la glucosa se administraba después del entrenamiento (Hall & Gold 1986, Hall & Gold 1992, Gold 1995). Así mismo, se ha observado que, en respuesta a una demanda cognitiva, los niveles de glucosa disminuyen en el líquido extracelular del hipocampo, actuando como un marcador de procesos mnemónicos (Manning et al 1993, Gold 2005).

En humanos se han obtenido resultados similares, con la administración de glucosa en pruebas donde se evalúa la memoria declarativa, en participantes tanto jóvenes como ancianos, de ambos sexos, y con patologías como esquizofrenia (Hall et al 1989, Parsons & Gold 1992, Benton & Owen 1993, Foster et al 1998, Newcomer et al 1999). De igual modo, se ha demostrado que en personas con disregulación de la glucosa y con diabetes tipo 2 que presentan deterioro en el desempeño neuropsicológico, relacionado principalmente con la memoria declarativa, la administración sistémica de glucosa, mejora el desempeño cognitivo (Messier & Gagnon 1996, Awad et al 2002). No solo la administración de glucosa se relaciona con buen desempeño cognitivo, sino que, en pruebas con contenido emocional, los niveles de glicemia post prueba aumentan, correlacionándose de manera positiva con el desempeño mnemónico (Blake et al 2001).

De acuerdo a estos resultados, un candidato a ser un paso intermedio en los efectos de la adrenalina en la memoria es la glucosa, basando esta aseveración en el hecho que la adrenalina no atraviesa la barrera hematoencefálica, pero su papel en la memoria sí ha sido claramente establecido, por ello, probablemente la adrenalina regule la formación de la memoria indirectamente a través de un mecanismo secundario, como la activación periférica de receptores adrenérgicos en el hígado, que conllevan a un aumento sistémico en la glucosa (Korol & Gold 1998).

Por otro lado, debido a la importancia de la glucosa en la memoria, se han llevado a cabo estudios orientados a dilucidar los mecanismos neurobiológicos responsables de este efecto, y una hipótesis planteada es que los efectos de la glucosa sobre la memoria pueden ser debidos a la simple producción de energía, o a la producción de uno o más de los neurotransmisores sintetizados a partir de la glucosa, por regulación de la función colinérgica central (Gold 1995, Kopf & Baratti 1996).

En esta secuencia de ideas, resulta interesante pensar que en una situación de estrés, como la generada por la exposición al LCE, el incremento de la glicemia no sólo se asocia a la disponibilidad energética para la actividad locomotora, sino también a los mecanismos mnemónicos que le permitirían al animal aprender de aquella experiencia “estresante”.

3.1.5 Herramientas para el Estudio de los Efectos del Estrés en los Procesos de Aprendizaje y Memoria en Modelos Animales

Las fases de adquisición y consolidación de la memoria son evaluadas en animales con el uso de tareas comportamentales que envuelven componentes de entrenamiento, cuyos efectos pueden ser evaluados posteriormente para determinar si el aprendizaje ocurrió y si la memoria a largo plazo se formó (Rodríguez et al 2006). Este proceso se inició con el empleo del condicionamiento pavloviano y el condicionamiento operante (Kjeldergaad 1967).

A continuación se presentan algunos ejemplos de pruebas utilizadas en modelos animales:

- **Laberinto acuático de Morris:** los animales son expuestos a una piscina en la que tienen que nadar para localizar una plataforma oculta. En la fase de adquisición, este procedimiento se lleva a cabo durante 60-120 segundos y se considera que el animal ha alcanzado el criterio cuando permanece en la plataforma por 5-10 segundos (criterio de aprendizaje). El número de veces y duración del ensayo dependen del protocolo (Bonsignore et al 2008). Después de esta fase de adquisición se realiza una prueba final donde se evalúa la retención, en esta ocasión sin plataforma, durante 60 ó 100 segundos; en este protocolo se evalúa la memoria espacial (Whiting et al 2008, Ramos 2010).

-Caja de escape-evitación (Shuttle Box): En esta prueba se emplea el condicionamiento clásico, con utilización de choques eléctricos (estímulo incondicionado) y un tono (estímulo condicionado). La prueba evalúa la evitación del lugar donde se presenta el choque y se miden variables como escape, no respuesta y número de cruzamientos. Tiene, como en los casos anteriores, una fase de entrenamiento (30 sesiones en algunos casos) hasta alcanzar el criterio de aprendizaje, con aproximadamente 80% de respuestas correctas. Luego es llevada a cabo la sesión donde se evalúa la retención del aprendizaje (Mandile et al 2003, Nordby et al 2006).

- Cámara de Condicionamiento operante (Caja de Skinner): es un instrumento caracterizado por contener algún tipo de mecanismo que garantice que el animal va a buscar alimento (previa privación de alimento). El animal debe accionar un tipo de mecanismo, por ejemplo pulsar una palanca, algo que no está en la naturaleza del animal hacer. Por ello, el animal debe “aprender” a llevar a cabo este tipo de conducta para obtener el reforzador (alimento). Al utilizar como criterio de aprendizaje presionar la palanca, en la fase de entrenamiento el animal debe realizar este proceso hasta la ocurrencia del 90% de respuestas correctas. Se evalúa el cambio en el comportamiento del animal, en el que sin entrenamiento, el animal ocasional o accidentalmente accionaría la palanca, a pasar a accionarla tantas veces como desee obtener el estímulo reforzador. Como su nombre lo indica, evalúa el condicionamiento operante (Winter et al 2009, Idris et al 2010).

-Laberinto en Y: la utilización de criterio de aprendizaje en este laberinto está basada en el desplazamiento de los animales hasta uno de los brazos donde encuentra algún tipo de recompensa, en la mayoría de los casos se utiliza alimento. Tiene una fase de entrenamiento que finaliza con la escogencia del brazo correcto 9 de cada 10 intentos. En la fase de evaluación del aprendizaje se mide la latencia de llegada al brazo o sitio correcto, con variaciones dependiendo del protocolo (Mcintyre et al 2003). Es un criterio basado en la recompensa y se evalúa la memoria espacial. Uno de los inconvenientes que presenta es la

privación que deben sufrir los animales, previo a la fase de entrenamiento (Mcintyre et al 2003, Pych et al 2006). Existen modificaciones de este laberinto, como el laberinto radial, empleando fases de entrenamiento similar (Hodges 1996).

Laberinto en T- Laberinto en cruz elevado: Estos laberintos poseen dos brazos abiertos y uno cerrado (Laberinto en T) o dos brazos abiertos y dos cerrados (LCE). Durante la fase de entrenamiento el animal debe permanecer en el laberinto tanto tiempo como sea necesario hasta alcanzar un tiempo de permanencia continua en los brazos cerrados, los tiempos utilizados son por ejemplo de 20s, 60s, 200s, 300s y 600s. Días después es llevada a cabo otra exposición con el objeto de evaluar los procesos mnemónicos, generalmente, por la medición de la latencia de salida a los brazos abiertos. En el caso de estos laberintos una sola sesión de entrenamiento es necesaria para encontrar cambios comportamentales asociados a procesos mnemónicos (Conde 1999, De Mello & Carobrez 2002, Tomaz et al 2003).

Los métodos y criterios de aprendizaje mencionados, han sido de gran ayuda en el estudio del comportamiento animal, sin embargo, presentan algunas desventajas como son el sometimiento de los animales a privación de alimento y/o agua (Salinas et al 1993, Salinas & Mcgaugh 1996), tortura (Williams & Mcgaugh 1993), así como requerir, en la mayoría de los casos, de mucho tiempo de entrenamiento (Salinas & Mcgaugh 1996).

Aunque son pocos los estudios realizados con criterio de aprendizaje en el LCE, Bertoglio y Carobrez (2000) encontraron, mediante el empleo del laberinto en T, en L, y en Cruz, que la existencia de, al menos dos diferentes ambientes es una característica clave en la sesión de entrenamiento para que se den los procesos de aprendizaje relacionados con evitación. Para hacer esta aseveración, ellos confinaron a los animales a brazos abiertos y cerrados en la primera exposición al laberinto, luego en una segunda exposición en el LCE completo, evaluaron el

comportamiento, encontrando que aquellos animales sometidos a confinamiento en brazo abierto en la sesión uno presentaban comportamiento similar a los sometidos por primera vez al LCE; así mismo, los confinados a brazos cerrados presentaron incremento en el tiempo en los brazos abiertos en la segunda exposición. Estos resultados, demostraron que, son necesarios al menos dos ambientes diferentes para modificar el comportamiento en una segunda exposición en el LCE. Además, encontraron que este cambio en el comportamiento, generado por una sola exposición del laberinto, permanece hasta por 3 meses (Bertoglio & Carobrez 2000).

Todo esto, hace viable la implementación de un criterio de aprendizaje en el LCE, donde, con solo una exposición al LCE, como fase de entrenamiento, se puedan inducir cambios comportamentales visibles en una segunda exposición, con lo cual, se puedan evaluar efectos mnemónicos.

La escogencia de diferentes tiempos de permanencia fuera de los brazos abiertos se basa en que la tendencia exploratoria de los animales está asociada principalmente con los lugares virtualmente seguros (brazos cerrados), sugiriendo que, en el caso de los roedores, el aprendizaje está basado en una oscilación entre la evaluación del riesgo (lugares centrales), así como la exploración de al menos dos ambientes, representados en el laberinto por los brazos abiertos y los cerrados. Apoyado en este comportamiento en el LCE, se asume que la experiencia en los brazos cerrados con acceso libre a los brazos abiertos, puede ser clave en el proceso de consolidación de la memoria emocional (Bertoglio & Carobrez 2000). Sin embargo, pueden encontrarse diferencias interindividuales en la reactividad (Conde et al 1999); por este motivo resulta conveniente medir el impacto del evento, en función del tiempo de permanencia continuo fuera de los brazos abiertos. Con el propósito de homogenizar el proceso de adquisición, el criterio permite que el animal explore libremente el LCE hasta cumplir un periodo de tiempo determinado.

3.2 SEGUNDA FASE: RELACIÓN ENTRE CONSUMO DE OXIGENO, HORARIO DEL DIA Y SEXO, Y COMPORTAMIENTO EN EL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO

3.2.1. Uso del Consumo de Oxígeno como Indicador de Impacto Emocional en Animales de Experimentación

El consumo de oxígeno (VO_2) es un parámetro que expresa el volumen de oxígeno que consume o utiliza un organismo en una unidad de tiempo. Es considerado como equivalente de la capacidad funcional del organismo (Bramante 1961), la cual se puede medir de forma absoluta, (L/min) o de forma relativa, (mL/Kg/min). Las metodologías utilizadas para su evaluación van desde cálculos matemáticos (Cerezo & García 2004, Medrano 2008, Torres et al 2008), hasta sistemas sofisticados con altos costos y con niveles tecnológicos exigentes (Messner-Pellenc et al 1994).

La determinación del consumo de oxígeno ha sido ampliamente utilizada en diferentes organismos, con el fin de determinar el estado funcional general del individuo y su relación con procesos metabólicos (Cerezo & García 2004), con el nivel de actividad física (Medrano 2008), y con la función cardiorrespiratoria, entre otras. A su vez, tal estado funcional es dependiente de aspectos que pueden considerarse como constitutivos [densidad de receptores, sistemas enzimáticos expresados genéticamente (Ball & Jungas 1961), sexo (Medrano 2008), edad (Medrano 2008) etc.]; y también de aspectos ambientales, que influyen en las necesidades adaptativas [nivel de estrés, consumo de alimentos y agua (Cerezo & García 2004, Yamaoka et al 2009), deficiencia de nutrientes (Adelman & Holliday 1977, Ohira et al 1981) condiciones del medio ambiente, (Cameron 1958, Cerezo et al 2004), fase del ciclo estral, ciclo circadiano (Yamaoka et al 2008, Yamaoka et al 2009), etc.]

Uno de los aspectos que se desea resaltar en relación al estado funcional, es el asociado con el ciclo circadiano, ya que es bien conocido que las secreciones endocrinas están influenciadas por este aspecto. No obstante, son pocos los estudios llevados a cabo, orientados a ahondar en cómo estas variables influyen o alteran el consumo de oxígeno en animales de experimentación.

Se ha encontrado que las catecolaminas responden a un incremento en la actividad física aumentando sus concentraciones plasmáticas hasta 4 veces más de lo que se presenta en reposo (Hulks et al 1991). La mayoría de estudios relacionados con consumo de oxígeno y catecolaminas, están orientados hacia la relación entre el estrés generado por la intensidad del ejercicio físico o por el estrés mental, con la activación del sistema nervioso simpático, así como con la respuesta simpatoadrenal, que lleva a un incremento endógeno en la secreción de adrenalina y noradrenalina, asumiendo que tal incremento es responsable de la mayoría de los efectos simpatoadrenérgicos presentados (Stallknecht et al 2001, Reims et al 2004).

Estudios llevados a cabo con el fin de evaluar la adaptación metabólica a diferentes situaciones, como el ejercicio (West et al 2006) o la exposición al frío, mostraron que el efecto de la adrenalina sobre el consumo de oxígeno es dosis dependiente, es decir, dosis bajas tienen poco efecto, moderadas lo aumentan, dosis altas lo disminuye (Himsworth 1968, Alexander et al 1972). En el caso de la disminución encontrada en dosis altas, se piensa que, es debido a una posible supresión voluntaria de la actividad muscular (Alexander et al 1972).

En estudios comparativos entre actividad física severa y moderada con aplicación de adrenalina, no se encontraron diferencias en variables como frecuencia cardiaca y consumo de oxígeno, en el grupo con actividad física moderada, y esto

probablemente, se deba a la baja dosis de adrenalina utilizada, la cual no produjo suficiente estímulo cardiopulmonar (West et al 2006).

A pesar de que tanto los niveles de catecolaminas, como el consumo de oxígeno se han utilizado como marcadores de estrés en diferentes situaciones (Bruder et al 1999), no se encuentra en la literatura científica información acerca de la relación existente entre este marcador de estrés y la exposición de ratas al LCE.

3.3. TERCERA FASE: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TIPO ANSIOLITICO DE NUEVOS COMPUESTOS HETEROCICLICOS EN RATAS EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO.

3.3.1 Ansiedad

La ansiedad puede ser una emoción normal que en condiciones normales le permite realizar sus funciones diarias al individuo, así como enfrentarse a nuevas situaciones de un modo eficaz. Este nivel de ansiedad es benéfico para el individuo, no obstante, cuando es sobrepasado, se habla de trastornos de ansiedad (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. 2000).

De acuerdo al DSM IV (1997) el trastorno de ansiedad es un estado emocional complejo que se presenta debido a un estímulo potencialmente peligroso, el cual ofrece un componente de incertidumbre, y va acompañado de alteraciones comportamentales y fisiológicas. Las manifestaciones se pueden agrupar de la siguiente manera:

- Físicas: palpitaciones, opresión en el pecho, temblor, sudoración excesiva, molestias digestivas acompañadas en algunas ocasiones de vómito, alteración de la alimentación, tensión y/o rigidez muscular, alteración del ciclo sueño/vigilia

- Psicológicas: sensación de amenaza o peligro, inseguridad, temor a perder el control de la vida, incertidumbre acerca de su vida y su futuro, dificultad para tomar decisiones, y en casos extremos temor a la muerte o locura.
- Comportamentales: permanente estado de alerta, hipervigilancia, impulsividad, dificultad para mantenerse quieto, torpeza en los movimientos, irritabilidad
- Cognitivas: dificultad de atención y de concentración, preocupación excesiva, entre otras.

La asociación americana de psiquiatría (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. 2000), ha clasificado los trastornos de ansiedad de la siguiente manera:

1. Trastorno de ansiedad generalizada (TAG): es un estado de ansiedad excesiva o aprehensión durante un tiempo aproximado de 6 meses; acompañado de otros síntomas neurovegetativos.
2. Trastorno de pánico: caracterizado por ataques de pánico recurrentes, inesperados y en algunos casos asociados a situaciones particulares. Los ataques se presentan de súbito, acompañados de intenso miedo o terror; la persona puede llegar a desarrollar sentimientos de muerte inminente, de pérdida de control. Además, están acompañados de cambios neurovegetativos, como palpitaciones, hipertensión, dificultad para respirar, transpiración, entre otros.
3. Trastorno obsesivo compulsivo: caracterizado por pensamientos angustiantes y molestos (obsesiones), y por comportamientos o rituales estereotipados (compulsiones).

4. Fobias específicas: son miedos irracionales a objetos, animales, o situaciones, como las alturas, sitios cerrados, entre otros.
5. Fobia social: es también conocida como trastorno de ansiedad social, en ésta la persona presenta una marcada ansiedad a situaciones sociales, tales como hablar en público, ir a fiestas, entre otras.

El TAG se constituye hoy por hoy en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, en Europa y Estados Unidos tiene prevalencia de 2% (Lieb et al 2005) y 5% (Fricchione 2004), respectivamente. En nuestro país, el estudio nacional de salud mental del año 2003 (Estudio nacional de salud mental-Colombia 2003) muestra a los trastornos de ansiedad como los más frecuentes problemas de salud mental en nuestra población, donde el 19.3% de los encuestados había sufrido alguna vez en su vida alguno de los trastornos de ansiedad antes mencionados.

Los costos del TAG incluyen no solo los gastos directos, como los servicios de atención primaria, la visita a especialistas u hospitalizaciones, sino también, gastos indirectos, tales como disminución en la productividad y las licencias por enfermedad (Albarracín et al 2008).

Estos datos ponen de manifiesto la importancia que tiene el TAG, lo que ha llevado al estudio de sus bases fisiológicas y neuroquímicas, para identificar alguna intervención terapéutica que permita reducir los costos y morbilidad asociados a esta patología.

3.3.2 Bases Etológicas de los Trastornos de Ansiedad

Para conocer y entender las bases fisiológicas subyacentes de los trastornos de ansiedad es importante analizar las bases adaptativas necesarias para la

supervivencia de las especies. De acuerdo a esto surgen los estudios etológicos, basados en observaciones sistemáticas de animales en su hábitat natural; originándose así, una nueva área de estudio conocida como análisis etoexperimental del comportamiento, de gran utilidad en la elaboración de constructos en psicología y psiquiatría. Uno de los aportes realizados tiene que ver con estrategias de defensa en animales, lo que brinda gran información en términos de la neurobiología de la ansiedad en humanos. De acuerdo a estudios realizados en esta área, se realizó la siguiente clasificación de estas estrategias:

- ◆ Evaluación del riesgo: es el primer nivel de defensa y se presenta cuando el peligro no está presente en el ambiente, estuvo previamente, o el ambiente es nuevo, implica tanto una recompensa como un ataque potencial, generando el conflicto de aproximación-evitación (Blanchard & Blanchard 1988).

- ◆ Inmovilidad: es el segundo nivel de defensa, es una estrategia de defensa desarrollada contra un peligro real, pero que se encuentra a cierta distancia (Blanchard & Blanchard 1988).

- ◆ Huida: es el tercer nivel de defensa, denominado también defensa proximal, se presenta cuando el peligro se encuentra a una distancia crítica, el animal interrumpe la inmovilidad y huye (Blanchard & Blanchard 1988).

- ◆ Amenaza defensiva y ataque: también hace parte de la defensa proximal, se presenta cuando no existe una vía de escape y el peligro se está aproximando, en el caso de algunos animales se presenta en forma de vocalizaciones y posturas particulares. Si la amenaza no surtió ningún efecto se presenta el ataque (Blanchard & Blanchard 1988).

En el caso de los seres humanos, las reacciones defensivas van acompañadas de sentimientos conscientes como la ansiedad, el miedo y el pánico, no obstante, el

funcionamiento del cerebro es similar en las especies mamíferas, de ahí la importancia de los estudios basados en modelos animales. Estos estudios sugieren que los diferentes patrones defensivos anteriormente mencionados están relacionados con el funcionamiento de ciertos circuitos neurales, que a su vez, podrían estar asociados con trastornos de ansiedad específicos (Tabla 1).

Uno de los análisis que ha ayudado a reafirmar esta aseveración son los farmacológicos, mediante los cuales se ha encontrado que, los mismos medicamentos utilizados en el tratamiento de los trastornos de ansiedad en humanos, pueden ser administrados en el laboratorio, bajo condiciones experimentales que modelen esta patología (Pellow et al 1985). Esto quiere decir que si los mismos procesos neurobiológicos están envueltos en el TAG y la evaluación del riesgo, situaciones experimentales que evoquen estrategias de defensa podrían ser manejados con medicamentos que afecten el TAG. Ejemplo de esto es el conflicto aproximación-evitación, el cual genera ansiedad. Un claro ejemplo de modelos que generan este tipo de conflicto es el LCE. El índice de ansiedad generado por estos modelos disminuye con el uso de medicamentos tales como las benzodiazepinas (Pellow et al 1985).

El segundo mejor modelo relacionado con TAG es el llamado respuesta emocional condicionada; en el cual, el congelamiento (freezing) de la rata es medido en una caja donde previamente el animal recibió choques eléctricos, en este modelo el congelamiento es el comportamiento utilizado para evaluar comportamientos de tipo ansioso y es atenuado por medicamentos utilizados en el TAG (Rodgers 1997).

Tabla 1. Relación entre estrategias defensivas y trastornos de ansiedad en humanos. Modificado de Shuhama et al (2007)

Fuente de peligro	Estrategia defensiva	Estructura cerebral	Emoción	patología
Potencial (conflicto)	Evaluación del riesgo	Septum de hipocampo, amígdala	Ansiedad	TAG
Estímulo condicionado	Congelamiento	Amígdala, sustancia gris periacueductal ventral	Ansiedad	TAG
Estímulo condicionado	Evitación	Amígdala	Miedo aprendido	Fobias específicas
Distal	Escape	Hipotálamo medial	Miedo innato	Fobias específicas
Proximal	Huida/congelamiento	sustancia gris periacueductal dorsal	Pánico	Trastorno de pánico

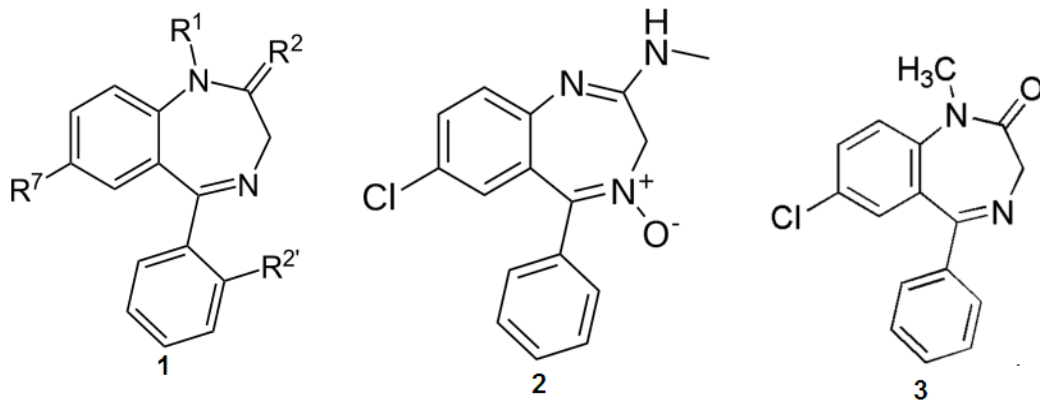
El estudio de posibles compuestos útiles en el tratamiento del TAG va de la mano con el estudio del ácido gamma aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitor en el sistema nervioso central de mamíferos, cuyos efectos son mediados a través de su interacción con los receptores GABA (A y B) (Stephenson 1988, Macdonald & Olsen 1994). Los receptores GABA-A (GABA-AR) se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro, con alta densidad en corteza frontal, hipocampo, cerebelo, núcleo interpeduncular y núcleo talámico (Bowery et al 1987).

Los GABA-AR actúan como guardabarreras del canal de cloro y son modulados alostéricamente por receptores cercanos, entre estos se encuentran sitios receptores de fármacos sedantes, proconvulsivos, esteroides y benzodiazepinas, entre otros. Siendo este último de gran importancia en el tratamiento de la ansiedad.

3.3.3 Mecanismo de Acción de las Benzodiazepinas

Las benzodiazepinas son moléculas que presentan un anillo de benceno con seis elementos, unido a otro anillo de diazepina con siete elementos. La estructura particular de cada benzodiazepina está dada por las sustituciones en diferentes posiciones de los radicales (figura 2).

Figura 2. Estructura de las benzodiazepinas. 1 estructura química general de las benzodiazepinas, 2. Estructura química del clordiazepóxido, 3. Estructura química del Diazepam



Los receptores GABA-A están dispuestos en forma de columnas helicoidales alrededor de un canal de cloro; cuando el GABA se une a su receptor GABA-A, sus columnas interactúan abriendo el canal de cloro, esto lleva a un aumento en su conductancia, lo que a su vez, inhibe la descarga de la neurona (inhibición del potencial de acción). Como ya se mencionó, existen, receptores cercanos a este, como los benzodiazepínicos que actúan como moduladores alostéricos positivos de la neurotransmisión inhibitoria rápida del GABA, y esto lo logra uniéndose al dominio extracelular de un subtipo del receptor GABA-A, esta unión potencia la capacidad del GABA de aumentar la conductancia del cloro a través de su canal (Ymer et al 1989).

La unión en simultáneo, del GABA y de la benzodiazepina, a sus respectivos receptores amplía enormemente la capacidad de la neurona para regular la neurotransmisión inhibitora rápida y es esto lo que finalmente produce los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas.

Vale la pena aclarar que las benzodiazepinas no sustituyen al GABA, el cual se une a la subunidad alfa, mientras que las benzodiazepinas se unen a la subunidad (gamma). Esto hace necesario que en la neurona estén presentes, tanto la subunidad alfa (α) como la subunidad gamma (γ), para que se pueda dar el efecto de la benzodiazepina (Katzung 2001).

3.3.4. Compuestos Heterocíclicos y Ansiedad

Los compuestos heterocíclicos son, quizá, los que más proliferan en la naturaleza y los que más se han estudiado desde el punto de vista sintético. Dentro de la variedad de sistemas heterocíclicos, los nitrogenados sobresalen por su inmenso impacto en la química medicinal y en el diseño de nuevos fármacos para suplir los requerimientos de la industria farmacéutica, particularmente aquellas moléculas que tienen en su estructura uno o dos anillos de benceno, fusionados a un anillo aza-heterocíclico parcialmente saturado de siete u ocho miembros, debido a su efectividad en el restablecimiento de la salud de personas afectadas por patologías del sistema nervioso central (Javaid 1994, Winocur & Gagnon 1998, Dal-Col et al 2003). Muchos compuestos de este tipo, hasta ahora creados, han resultado ser efectivos agentes antidepresivos, antipsicóticos y ansiolíticos (Javaid 1994, Winocur & Gagnon 1998), de ahí, la importancia de probar la eficacia o funcionalidad de nuevos compuestos con similares bases bioquímicas a fármacos ya existentes, que puedan presentar propiedades ansiolíticas y/o sedantes, como las empleadas en este proyecto, las cuales son moléculas derivadas de la tetrahydro-1-benzoazepina, cuyos nombres sistemáticos son: 7-metil-*cis*-4-hidroxi-2-(1'-naftil)tetrahydro-1-benzoazepina (**CAR24R**), 7-flúoro-2-*exo*-(*trans*-estiril)-1,4-

epoxitetrahydro-1-benzodiazepina (**LIA3M12**) y 7-bromo-2-exo-fenil-1,4-epoxi-tetrahydro-1-benzodiazepina (**SAM159C2**) (ver figura 3).

Figura 3. Estructura química general de las benzodiazepinas y de las tres nuevas moléculas evaluadas.

3.3.5. Uso del Laberinto en Cruz Elevado en la Evaluación de Compuestos Ansiolíticos

El LCE es una herramienta ampliamente utilizada y validada como modelo para evaluar ansiedad, sus bases fisiológicas y farmacológicas, en roedores. Está basado en la aversión natural de algunos roedores a los espacios abiertos y a las alturas (Pellow et al 1985, Rodgers & Dalvi 1997, Holmes & Rodgers 1998).

Dentro de los modelos etológicamente fundamentados, el LCE se ha destacado debido a su facilidad de implementación y por ser un modelo animal útil en el estudio de la ansiedad generalizada. Su fundamento es la aversión presentada por algunos roedores a los espacios abiertos, prefiriendo por ello, los lugares cerrados. En este modelo se evalúa la exploración libre de los roedores en dos ambientes distintos, uno potencialmente aversivo (brazo abierto) y otro virtualmente seguro (brazo cerrado). Además de presentar la ventaja de ser un modelo etológicamente fundamentado, presenta otras ventajas: su procedimiento es simple; no envuelve el uso de equipos costosos; está basado en

comportamientos espontáneos del animal, por tanto, no necesita de entrenamientos largos ni del uso de ningún estímulo nocivo, tales como choques eléctricos o la privación de alimento o agua; y por último, es capaz de identificar efectos tanto ansiolíticos como ansiogénicos de fármacos en idénticas condiciones (Pellow et al 1985, Conde et al 1999).

Debido a su gran utilidad, se han llevado a cabo validaciones de este modelo desde tres puntos de vista (Pellow et al 1985):

-Comportamental: para lograr esta validación Pellow y colaboradores se valieron de varias metodologías, como la escogencia de dos razas de ratas, en las cuales no observaron diferencias significativas en cuanto a las variables comportamentales evaluadas. También tuvieron en cuenta el tipo de brazo (abierto o cerrado) hacia el cual se orientaba la cabeza del animal al inicio del experimento, no encontrando diferencias significativas en los comportamientos debido a esto. Por último, para medir comportamientos relacionados con ansiedad, se confinó a un grupo de animales a los brazos abiertos y a otro a los brazos cerrados; encontrando que, los confinados a brazos abiertos presentaron mayor número de bolos fecales, mayor tiempo en comportamientos de congelamiento (freezing) y de inmovilidad, al ser comparados con los confinados a brazos cerrados.

-Fisiológica: para obtener esta validación midieron concentraciones plasmáticas de corticosterona en animales confinados al brazo abierto, en confinados a brazo cerrado y en animales que permanecieron en sus jaulas. Encontrando que, el confinamiento tanto en brazo abierto como cerrado produjo un aumento en los niveles plasmáticos de corticosterona con respecto a los que permanecieron en sus jaulas, y que los confinados a brazo abierto presentaron a su vez, un aumento mayor en los niveles de corticosterona con respecto a los confinados en brazo cerrado. Mostrando todo esto que, la sola exposición al ambiente nuevo tiene

efecto sobre variables fisiológicas relacionadas con acontecimientos estresantes, pero que es el confinamiento en los brazos abiertos el que produce la mayor intensidad del estímulo.

- **Farmacológica:** pretendió encontrar aumento selectivo en exploración en brazos abiertos con fármacos utilizados en el tratamiento de TAG. Para esto se utilizaron diferentes benzodiazepinas, ansiogénicos, sedantes, antipsicóticos, y antidepresivos. Los resultados mostraron que con la administración de fármacos ansiolíticos, utilizados clínicamente, aumentaron las salidas y tiempo de permanencia en brazos abiertos; así como una disminución en estos parámetros comportamentales cuando se utilizaron fármacos que producen ansiedad en humanos. El uso de sedantes, antipsicóticos y antidepresivos no tuvo efecto significativo en estas variables.

El pentilentetrazol, fármaco estimulante del sistema nervioso central, ha sido empleado en modelos animales para el estudio de la epilepsia, así como en modelos animales para el estudio de propiedades de tipo ansiolítico o ansiogénico, como el laberinto en cruz elevado en el cual, a dosis de 10-20mg/Kg produce efectos de tipo ansiogénico, disminuyendo la actividad en los brazos abiertos de los roedores (Pellow et al 1985).

Teniendo en cuenta la validación del laberinto como un modelo confiable en el estudio de la efectividad de medicamentos ansiolíticos, la presente propuesta pretende utilizar esta herramienta para determinar el potencial terapéutico de diferentes dosis de nuevos compuestos heterocíclicos.

4. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en tres fases experimentales: en la primera fase se exploraron los efectos de tres criterios de aprendizaje relacionados con tiempo de permanencia continua fuera de brazos abiertos del LCE, sobre variables comportamentales y fisiológicas, en un grupo tratado con un ansiolítico y otro con solución salina (sin medicamento activo). En la segunda fase se llevó a cabo la evaluación del consumo de oxígeno en diferentes horarios del día (am y pm) en ratas de ambos sexos con el fin de estandarizar y evaluar la reproducibilidad del método utilizado por nuestro laboratorio para este fin, así como la determinación de los efectos de una dosis de adrenalina sobre el consumo de oxígeno y su correlación con variables comportamentales presentadas en los mismos animales expuestos al LCE. Por último, en la fase tres se evaluó el efecto sobre variables comportamentales (de tipo ansiolítico y/o ansiogénico y sobre la memoria) de tres nuevas moléculas derivadas de la tetrahydro-1-benzoazepina, en ratas expuestas al LCE, utilizando además tres grupos controles, uno con ansiolítico, otro con ansiogénico y por último, uno con solución salina como control general.

4.1 DISEÑO

Estudio experimental controlado.

4.2 CONDICIONES GENERALES DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales fueron trasladados del bioterio de reproducción al bioterio de experimentación de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de

Santander, 72 horas antes de iniciar los experimentos, y permanecieron en este lugar hasta finalizar los mismos. Fueron alojados en grupos de 5-6 individuos por cada jaula (50x30x15cm), con agua y alimento disponible libremente (*ad libitum*). Fueron mantenidos en condiciones de temperatura constante de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $65\pm 5\%$, bajo ciclos de 12 horas de luz/oscuridad (con luz a partir de las 7.00h hasta las 19:00h) y ambiente bajo en ruido. Todas las sesiones experimentales se realizaron en el ciclo claro, entre las 9 y las 18 horas.

La sala de experimentación donde se encontraba el LCE estaba contigua al bioterio de experimentación, presentando las mismas condiciones ambientales de temperatura y humedad, con aire acondicionado y extractor, para mantener la circulación del aire a una temperatura estable. Esta es una sala de aproximadamente 4 metros cuadrados, iluminada con una lámpara de luz blanca (296 lux); con una videocámara ubicada en el techo, a 1.5 metros aproximadamente del laberinto. El experimentador estuvo fuera de la sala de experimentación mientras se llevaba a cabo la exposición en el LCE.

4.3 CONDICIONES GENERALES DEL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO

El LCE es un dispositivo de madera con cuatro brazos dispuestos en forma de cruz. Cada brazo mide 50x12cm y están elevados 50 cm sobre el suelo; dos de sus brazos, denominados brazos cerrados (BC), están colocados uno al frente del otro, con paredes laterales de 40 cm, permitiendo únicamente como vía de acceso el centro del laberinto, el cual es un cuadrado de 12x12cm. Los otros dos brazos, denominados brazos abiertos (BA), poseen las mismas dimensiones e igual orientación, pero tienen como paredes laterales un pequeño borde acrílico transparente de 2cm de altura (figuras 4 y 5). Para llevar a cabo un análisis más detallado del comportamiento de los animales en el LCE, se realizó una división virtual por lugares, siete lugares en total distribuidos de la siguiente forma: 1-3

correspondientes a los brazos cerrados, 4 al centro del laberinto y 5-7 correspondientes a los brazos abiertos (ver figura 6).

Todas las sesiones fueron monitoreadas y grabadas mediante un circuito cerrado de televisión y un sistema de VHS para posterior registro y análisis de comportamientos utilizando el PROSTCOM (Conde et al 2000); un conjunto de programas computacionales diseñados para tal fin (Conde et al 1999, Conde et al 2001, Uribe et al 2002).

Figura 4. Fotografía del Laberinto en Cruz Elevado



Figura 5. Esquema del LCE con sus dimensiones (Adaptado de Delgado 2008)

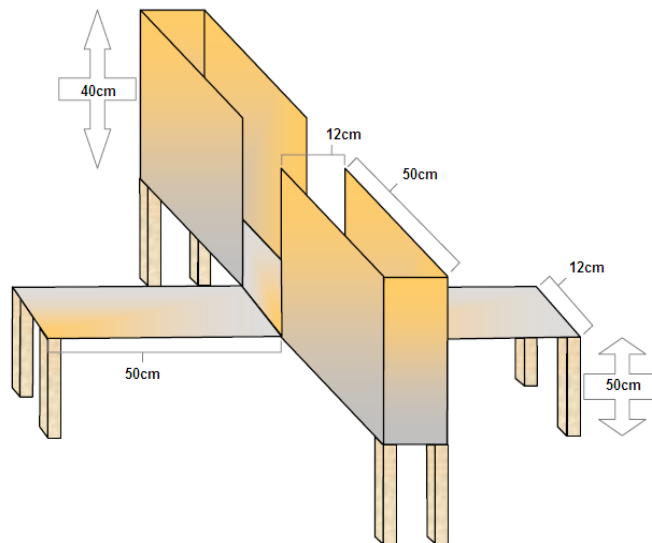
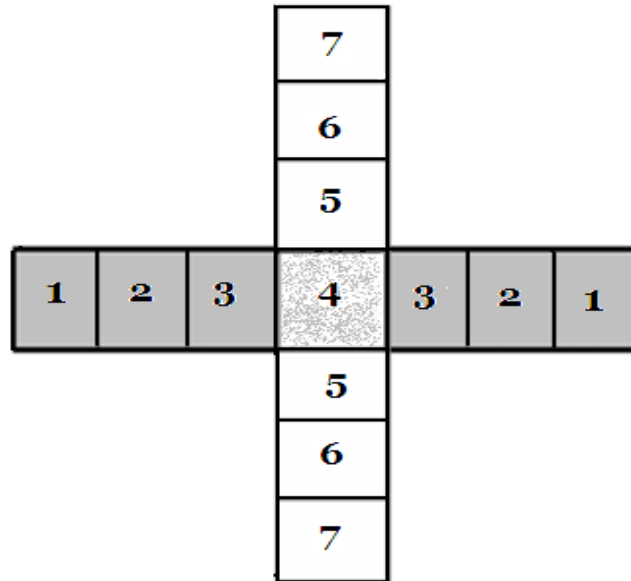


Figura 6. División virtual del LCE. Las zonas grises corresponden a los brazos cerrados, zonas blancas a los brazos abiertos y el lugar 4 corresponde al centro del laberinto



4.4 MANIPULACION Y PESAJE DE LOS ANIMALES

La manipulación se llevó a cabo 24 horas antes de la primera exposición al LCE o de la medición del consumo de oxígeno, durante un minuto. Para la obtención del peso de los animales se utilizó una báscula mecánica (Ohaus, NJ USA), introduciendo amablemente al animal dentro de una cesta metálica, con previa calibración de la báscula; el pesaje se llevó a cabo el mismo día de los procedimientos experimentales, en horas de la mañana, en un cuarto adyacente al bioterio de experimentación.

4.5 PROCEDIMIENTOS DETALLADOS

4.5.1 Fase 1. Aplicación de Criterio de Aprendizaje y Medicion de Niveles de Glucosa en Ratas Wistar-Uis Expuestas al Lce

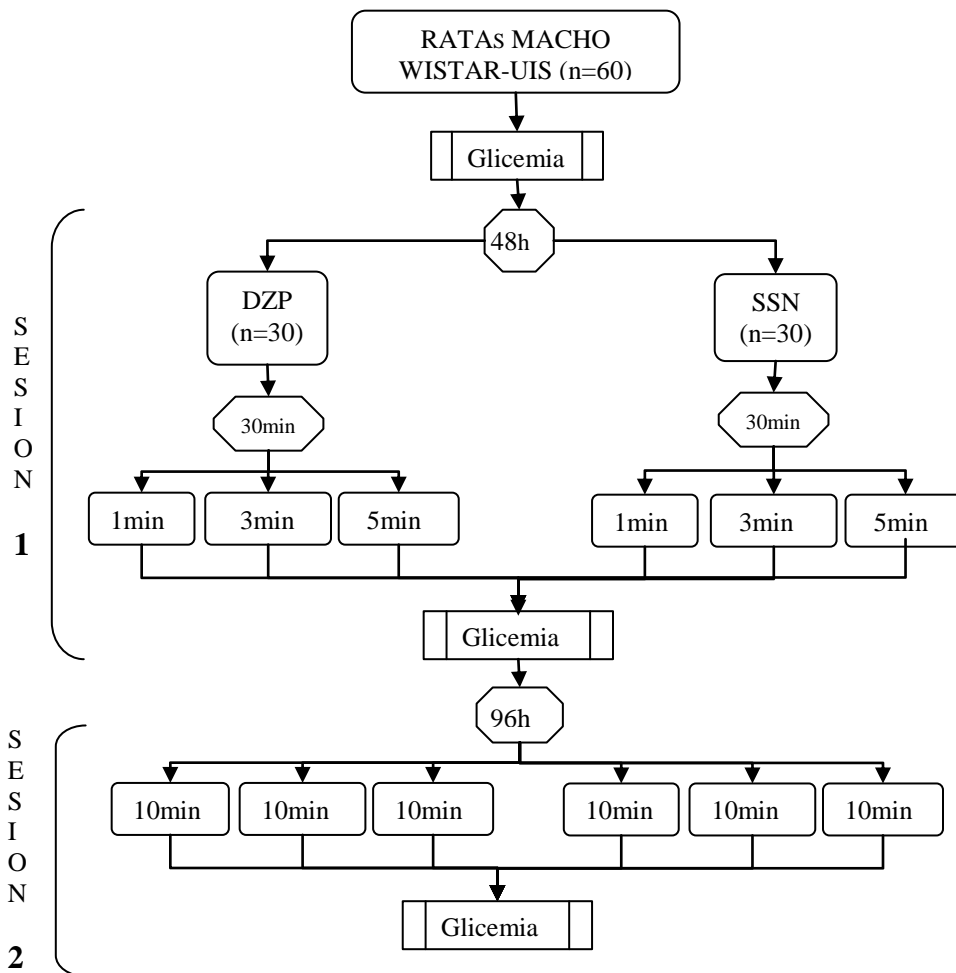
4.5.1.1 Animales: Se utilizaron 60 ratas macho Wistar-UIS, provenientes del bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander (UIS), de 8-10 semanas de edad, con pesos de 240 ± 20 gramos. Alojadas en grupos de 6 individuos por cada caja vivero. Todos los animales fueron manipulados una vez por día por aproximadamente un minuto, 24 horas antes de la primera exposición al LCE.

4.5.1.2 Farmacos Y Reactivos: Se utilizó como medicamento ansiolítico Diazepam (DZP) (Labs. Viteco, Colombia) en ampollas de 10mg/2mL. La elección del DZP como la benzodiazepina de este estudio se basó en que ha demostrado tener propiedades de tipo ansiolítico en ratas expuestas al LCE (Pellow et al 1985, Gareri et al 2000). La dosis fue de 2 mg/Kg y las diluciones fueron llevadas a cabo con solución salina normal (SSN) al 0.9% (Labs. Quibi, Colombia), la cual sirvió, así mismo, como vehículo control.

4.5.1.3 Procedimientos: Las sesiones fueron llevadas a cabo entre las 13h y 18h, las ratas se asignaron aleatoriamente a 6 grupos experimentales de acuerdo a los tres criterios de aprendizaje y a los dos tratamientos farmacológicos (Figura 7), 10 animales por cada grupo, este número está basado en estudios previos que demuestran que con este tamaño de muestra se encuentran diferencias significativas entre grupos experimentales. De acuerdo al grupo de tratamiento al que pertenecieran, se les aplicó vía intraperitoneal (IP) DZP ó SSN. Después de 30 minutos fueron sometidas al LCE con su cabeza orientada hacia uno de los BC, permitiendo su exploración libre hasta alcanzar 1, 3 ó 5 minutos de permanencia continua fuera de los brazos abiertos. 96 horas después, en ausencia de

medicamento, se llevó a cabo la evaluación de la memoria por re-exposición de los animales al LCE, por un tiempo total de 10 minutos de exploración libre. La limpieza del laberinto se llevó a cabo antes de la exposición del primer animal y entre exposiciones, con algodón humedecido en solución de etanol (10% v/v) y secado con papel absorbente. La determinación de los niveles de glicemia se realizó en sangre venosa, 48 horas antes de la exposición al LCE e inmediatamente después de cada sesión experimental, mediante un glucómetro (CONTOUR TS (BAYER)) (Solnica et al 2003, Esquivel et al 2006). La muestra se tomó por punción de la vena lateral de la cola de cada animal, utilizando aguja hipodérmica, para la inmovilización de cada animal, se utilizó el mismo dispositivo utilizado para evaluar el VO_2 (Fig 8).

Figura 7. Diseño experimental fase 1. Aplicación de criterio de aprendizaje y medición de niveles de glicemia



4.5.1.4 Variables Evaluadas: Los parámetros comportamentales analizados, en ambas sesiones experimentales en el LCE fueron la duración de la sesión 1, el porcentaje de la frecuencia de entradas a brazos abiertos (%EBA), el porcentaje del tiempo de permanencia en brazos abiertos (%TBA), el número de cruzamientos a las diferentes secciones del laberinto (cruzamientos) y la latencia de salida a brazo abierto. Adicionalmente fueron analizados el porcentaje de entradas y porcentaje de tiempo en lugares específicos del laberinto (lugares 1, 3,

4, 5, 6 y 7) y la evolución cada 30 segundos de estas mismas variables en los lugares 1, 4 y 7. Se evaluaron también los niveles de glicemia basal y post-sesiones experimentales.

4.5.1.5 Análisis Estadístico: Para llevar a cabo el análisis de esta fase y determinar la existencia de diferencias en los valores de las variables estudiadas entre los diferentes grupos experimentales, se realizó un test de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (tratamiento farmacológico x criterio de aprendizaje) para cada variable evaluada, seguido de análisis de Bonferroni como prueba *post hoc*, tanto en la sesión uno como en la sesión 2. Adicionalmente, dentro de cada grupo fueron comparados los valores de cada variable entre la sesión 1 y 2 mediante una prueba t.

Para el análisis de evolución temporal de las variables comportamentales, se realizó una prueba t para determinar la existencia de diferencias en los valores promedio de %EBA y %TBA cada 30 segundos en los lugares 1, 4 y 7 de acuerdo al criterio y tratamiento utilizados. Por último, para determinar la existencia de relación entre los niveles de glicemia y las variables comportamentales evaluadas, se realizaron análisis de correlación de Pearson o Spearman de acuerdo a la distribución de las variables por cada criterio y tratamiento utilizados. El nivel de significancia se fijó en el 5%. Los análisis fueron realizados usando el software SigmaStat 3.5 (SPSS Inc., Chicago, IL) o STATA 8.0 (Stata Corp., 2003, College Station, TX).

4.5.2 Fase 2. Relación entre Consumo de Oxígeno, Horario del Día, Sexo, y Comportamiento en el LCE

4.5.2.1 Fase 2.1: Consumo de Oxígeno por Horario y Sexo en Ratas Wistar-UIS

4.5.2.1.1 Animales: Fueron evaluadas 54 ratas (20 hembras y 34 machos) Wistar-UIS. La distribución por sexo y horarios de evaluación, así como los pesos de las ratas en los grupos, se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Distribución de animales según género y horario. El horario “am” fue entre las 9 y 11 horas. El horario “pm” entre las 15 y 18 horas.

DISTRIBUCIÓN DE LOS ANIMALES SEGÚN GÉNERO Y HORARIO			
Sexo	Am	Pm	Total general
Hembra	10	10	20
Macho	17	17	34
Total general	27	27	54

Peso de los animales (gr) ± 1 D.E			
Sexo	Am	Pm	Total general
Hembra	259.50 (23.16)	259.50 (23.16)	259.50 (22.54)
Macho	357.88 (30.04)	361.00 (34.44)	359.44 (31.86)
Total general	321.44 (55.54)	323.41 (58.40)	322.43 (56.46)

4.5.2.1.2 Consumo de Oxígeno: El equipo utilizado para evaluar el consumo de oxígeno consistió en una cámara que contenía una malla con cal sodada para atrapar el dióxido de carbono (CO₂) exhalado y que con la ayuda del desplazamiento de una burbuja de agua jabonosa a través de una pipeta, permitió la medición de los mililitros de desplazamiento durante un tiempo controlado (Figura 8) (Benedict & MacLeod 1929, Himsworth 1968). La evaluación del

consumo de oxígeno se llevó a cabo en una sala adyacente al bioterio de experimentación, bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad.

Figura 8. Cámara para registro del Consumo de Oxígeno para animales pequeños



4.5.2.1.3 Farmacos y Reactivos: En la evaluación del consumo de oxígeno, se utilizó cal sodada granulada (Soda Lime®, Reactivos RD, Colombia). Para la obtención de la burbuja se utilizó una solución jabonosa, basada en jabón líquido y agua (dilución 1:10). En la limpieza del laberinto y del dispositivo para la medición del consumo de oxígeno, se utilizó alcohol antiséptico al 10% (v/v) (Labs. Tecnoquímicas, Colombia).

4.5.2.1.4 Procedimientos: Se tomó cada animal directamente de su caja vivero y se introdujo amablemente dentro del dispositivo para medición de consumo de oxígeno, posteriormente el tubo del dispositivo fue sellado herméticamente mediante un tapón de caucho, en cuya parte central se encontraba una pipeta de 10mL. Previa lubricación con agua jabonosa (jabón líquido a una dilución de 1:10), en el extremo de la pipeta se colocó una gota de la solución jabonosa permitiendo la formación de una burbuja, y posteriormente fue anotado el desplazamiento de

la burbuja en un minuto. El primer minuto, fue utilizado como período de adaptación del animal a la cámara y el dato del consumo de oxígeno fue descartado. Posteriormente, se llevaron a cabo tres mediciones consecutivas por cada animal, destapando el dispositivo entre cada medición para permitir el recambio de oxígeno. Fueron registrados los valores de temperatura y humedad relativa, presentes en el ambiente en el momento de realizar la medición. Con base en estas condiciones de medidas ambientales (ATPS), se transformaron los valores a condiciones estándar (STPD), de 760 mmHg de presión, 273° Kelvin y aire seco. Los datos de consumo de oxígeno se expresaron en función del peso de los animales (mililitros por cada 100 gramos de peso). Se llevaron a cabo las mediciones en horas de la mañana (9h-11h) y en horas de la tarde (15h-18h).

4.5.2.1.5 Variables Evaluadas: Fue evaluado el consumo de oxígeno (mililitros por cada 100 gramos de peso en un minuto, en STPD) de acuerdo al sexo y horario de evaluación (utilizando los promedios de las tres mediciones de cada animal).

4.5.2.1.6 Análisis Estadístico: Para la evaluación de la reproducibilidad de las medidas realizadas dentro de cada grupo de animales, se realizó un ANOVA de medidas repetidas, con las tres medidas de cada grupo, seguido de Holm Sidak como prueba *post hoc*. Luego de esto, y con el fin de evaluar el consumo de oxígeno por género y horario se realizó un test de ANOVA de dos factores con los promedios de las tres mediciones de cada animal, seguido de Bonferroni como prueba *post hoc*. El nivel de significancia se fijó en el 5%.

4.5.2.2 Fase 2.2: Correlación entre Consumo de Oxígeno Basal y Post- Aplicación de Adrenalina don Manifestaciones Comportamentales de Ansiedad y Desempeño Mnemónico

4.5.2.2.1 Animales: Fueron evaluadas 10 ratas macho Wistar-UIS con pesos de 215 ± 15 gramos y una distribución de 5 animales por cada jaula. Los animales fueron manipulados aproximadamente por un minuto, 24 horas antes de la evaluación del consumo de oxígeno.

4.5.2.2.2 Farmacos Y Reactivos: Se utilizó adrenalina (Labs. Baxter, Colombia), ampolla de 1mg/mL, la dosis utilizada fue de 0,05 mg/Kg, (Korol & Gold 1998) disuelta en solución salina normal al 0.9%.

4.5.2.2.3 Procedimientos: El procedimiento de medición de consumo de oxígeno se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en el apartado anterior. Se hizo una medición basal (tres mediciones por cada animal) e inmediatamente después se inyectó adrenalina por vía intraperitoneal, a dosis de 0,05 mg/Kg (Korol & Gold 1998), en un volumen de 1 mL/Kg. De 15 a 20 minutos después se repitieron las tres mediciones del consumo de oxígeno, las cuales se expresaron en condiciones estándar de temperatura y presión del gas seco (STPD). 48 horas después, los animales fueron expuestos en una primera sesión al LCE durante 5 minutos de exploración libre, siguiendo el mismo procedimiento descrito en la fase uno, y 72 horas después se llevó a cabo la segunda exposición al LCE, nuevamente por 5 minutos de exploración libre. La exposición al laberinto se llevó a cabo sin la utilización de medicamentos.

4.5.2.2.4 Variables Evaluadas: Se evaluaron los mililitros de consumo de oxígeno pre y post inyección intraperitoneal de adrenalina (mL/100gr/min, en condiciones STPD).

Los parámetros comportamentales analizados en el LCE fueron el porcentaje de la frecuencia de entradas a brazos abiertos, brazos cerrados y centro del laberinto (%EBA, %EBC, %EC), el porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos, brazos cerrados y centro del laberinto (%TBA, %TBC, %TC), latencia de salida a brazo abierto, número de cruzamientos y entradas, y tiempo en los lugares 1 y 5.

4.5.2.2.5 Análisis Estadístico: Para el análisis del cambio en los niveles de consumo de oxígeno pre y post aplicación de adrenalina, se realizó análisis de t test pareado con los promedios de las tres medidas realizadas en cada tiempo. Para la evaluación del consumo de oxígeno y su relación con el comportamiento en el LCE, se llevó a cabo análisis de correlación de Pearson o Spearman de acuerdo a la distribución de las variables.

4.5.3 Fase 3. Evaluación de Efectos de Tipo Ansiolítico de 1,4-Epoxi-2-Aril(2-Estiril)Tetrahydro-1-Benzoazepinas En Ratas Expuestas Al LCE

4.5.3.1 Animales: Fueron utilizadas 103 ratas machos Wistar-UIS con pesos de 210 ± 30 gramos, provenientes del bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Las ratas fueron mantenidas en grupos de 6 animales por jaula con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, con condiciones de humedad y temperatura controladas y libre acceso a agua y alimento. Los animales fueron manipulados aproximadamente por un minuto, 24 horas antes de la exposición al LCE

4.5.3.2 Fármacos y Reactivos. Se evaluaron tres nuevas moléculas sintetizadas en el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Universidad Industrial de Santander, derivadas de la tetrahydro-1-benzoazepina (**CAR24R**, **LIA3M12**, **SAM159C2**). En el caso de las moléculas **CAR24R** y **LIA3M12** se usaron dosis de 5 y 10 mg/Kg, mientras que con la molécula **SAM159C2** se utilizaron dosis de 10 y 25 mg/Kg.

Las moléculas fueron suspendidas en solución salina normal (SSN) al 0.9% (p/v). Como control positivo del efecto ansiolítico se aplicó el diazepam a dosis de 2 mg/Kg en otro grupo de ratas, y como control ansiogénico se utilizó el pentilentetrazol (PTZ) en una dosis de 20 mg/Kg. Como control general se utilizó solución salina al 0.9%. El volumen de aplicación fue de 1 mL/Kg para todos los medicamentos. Las dosis fueron aplicadas por vía intraperitoneal, 30 minutos antes de la primera exposición de cada rata al LCE. Las 103 ratas inyectadas fueron distribuidas en los 9 grupos de acuerdo al tratamiento recibido.

4.5.3.3 Síntesis de las Nuevas Moléculas

La síntesis estereoselectiva de cada una de las tres nuevas tetrahydro-1-benzoazepinas sustituidas en la posición C-2 con un anillo de naftaleno (**CAR24R**), con un anillo de benceno (**SAM159C2**) y con un fragmento *trans*-estirilo (**LIA3M12**), se realizó siguiendo la secuencia de transformaciones químicas que se muestra en la figura 9, implementando protocolos reportados en la literatura con modificaciones propias (Murahashi et al 1990, Anderson & Lai 1995, Yopez et al 2006, Gómez-Ayala et al 2006).

En el esquema general de síntesis (Figura 9), las orto-alilanilinas **1a-c** (R = CH₃, F, Br) fueron transformadas inicialmente en las correspondientes orto-alil-N-(1-naftalenmetil)anilina **2a**, orto-alil-N-(*trans*-cinamil)anilina **2b**, y orto-alil-N-bencilanilina **2c** mediante reacciones de amino-reducción indirecta y de N-cinamilación, respectivamente. En la etapa clave de la síntesis, las orto-alilanilinas **2a-c** fueron transformadas en los compuestos de interés **LIA3M12**, **SAM159C2** y en el 1,4-epoxi-cicloadducto **3a**, precursor de **CAR24R**, a través de una oxidación selectiva con peróxido de hidrógeno en la presencia de cantidades catalíticas de tungstanato de sodio, y la subsiguiente cicloaddición intramolecular 1,3-dipolar de las nitronas generadas in situ. Para acceder al tercer producto de interés **CAR24R**,

fue necesaria una etapa adicional en la cual se realizó la apertura reductiva de su 1,4-epoxi-cicloadducto con cinc en ácido acético.

Los tres productos finales fueron purificados por cromatografía en columna, y sus estructuras y estereoquímica establecidas por resonancia magnética nuclear de alta resolución (RMN ^1H , RMN ^{13}C) unidimensional y bidimensional.

Figura 9. Síntesis de las moléculas SAM159C2, CAR24R, LIA3M12

4.5.3.4 Procedimientos: Las 103 ratas utilizadas en el experimento fueron divididas en 9 grupos, 6 de los cuales recibieron una de las moléculas desarrolladas (**CAR24R** o **LIA3M12** a dosis de 5 o 10 mg/Kg, y **SAM159C2** a dosis de 10 o 25 mg/Kg), mientras que otros tres grupos recibieron diazepam a dosis de 2 mg/Kg, como control del efecto ansiolítico de las nuevas moléculas, pentilentetrazol en una dosis de 20 mg/Kg, como control ansiogénico, o solución salina al 0,9%, como control general.

Fueron realizadas dos sesiones de exposición de las ratas al LCE. Treinta minutos antes de la primera exposición al laberinto, cada rata recibió el medicamento asignado vía intraperitoneal. Posteriormente fue ubicada gentilmente en el centro del laberinto con su cabeza orientada hacia uno de los brazos cerrados, permitiendo su exploración libre durante 5 minutos. Los parámetros comportamentales analizados en el LCE durante este periodo fueron el porcentaje de la frecuencia de entradas a brazo abierto (%EBA), el porcentaje del tiempo de permanencia en brazo abierto (%TBA), y el número de cruzamientos a las diferentes secciones del laberinto (cruzamientos). Setenta y dos horas después, las ratas fueron llevadas a una segunda exposición al LCE, para evaluar los efectos mnemónicos de los medicamentos utilizados en la primera sesión. Nuevamente fue evaluado el comportamiento de la rata durante su permanencia en el laberinto por 5 minutos.

En un experimento piloto preliminar se utilizó como vehículo la carboximetilcelulosa sódica (Fontela et al 2006, Yépez et al 2006). En ese experimento, se observó que dicha sustancia produjo un efecto de tipo ansiogénico, al igual que una dosis alta de **SAM159C2** suspendida en ese vehículo. Sin embargo, el grupo tratado con el nuevo fármaco, presentó una tendencia a incrementar las entradas y permanencia de las ratas en los brazos abiertos con respecto a ese control, sin que sus resultados se aproximaran al control positivo del diazepam, lo que hizo sospechar de un potencial efecto ansiolítico enmascarado por el vehículo. Con base en estos resultados, y en el inconveniente de la baja solubilidad de la nueva molécula en soluciones acuosas, se decidió suspender en SSN menores dosis de los nuevos fármacos, y utilizar la SSN como vehículo.

4.5.3.5 Análisis Estadístico: Para determinar la existencia de diferencias en los valores de las variables estudiadas entre los diferentes grupos experimentales se utilizó, de acuerdo a la distribución de la variable, el test ANOVA de una vía, seguido de análisis de Bonferroni para comparaciones múltiples corregidas, o la

prueba Kruskal-Wallis seguida del test de Dunn's como prueba *post hoc*. Adicionalmente, dentro de cada grupo fueron comparados los valores de cada variable entre la sesión 1 y 2 mediante una prueba t pareada. El nivel de significancia se fijó en el 5%. Todos los análisis fueron realizados usando el software SigmaStat 3.5 (SPSS Inc., Chicago, IL).

4.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Salud de la Universidad industrial de Santander, código **CB09017**, y se rige por la legislación colombiana para el manejo de animales de laboratorio. (Ministerio de Salud resolución número 8430 de 1993).

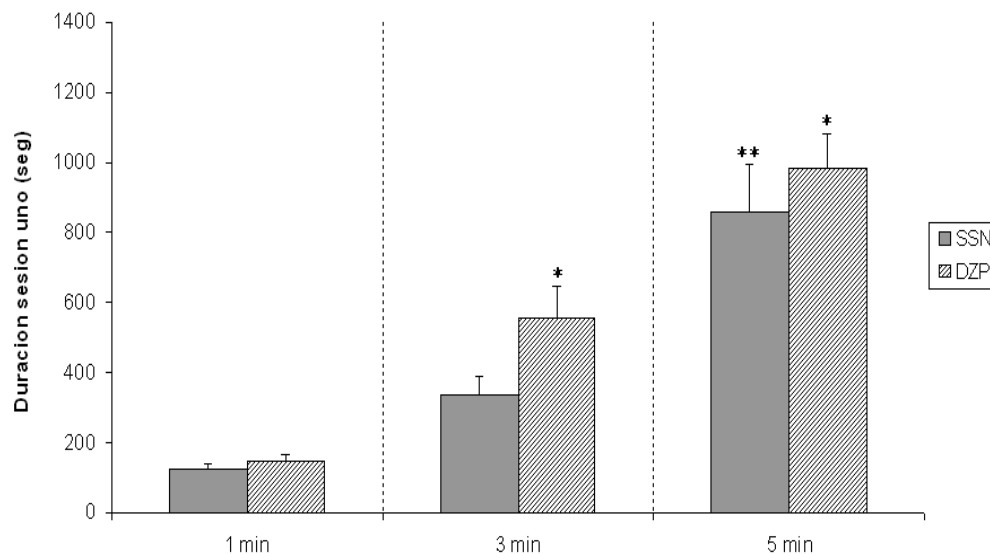
5. RESULTADOS

5.1 FASE 1. IMPACTO DE LOS CRITERIOS DE APRENDIZAJE SOBRE LOS COMPORTAMIENTOS INDICADORES DE ANSIEDAD Y EL DESEMPEÑO MNEMONICO DE RATAS WISTAR-UIS

5.1.1 Duración Sesión uno (T Sesión Uno)

El análisis de varianza de dos vías (tratamiento x criterio) reveló diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a criterio ($F(2,54)=48,177$, $p<0,001$), sin embargo no se encontraron diferencias significativas de acuerdo al tratamiento ($F(2,54)=3,491$, $p=0,067$), o interacciones entre los dos factores ($F(2,54)=0,747$, $p=0,479$) (Figura 10).

Figura 10. Comparación de la duración sesión uno (segundos) de acuerdo a tratamiento y criterio de aprendizaje. SSN, solución salina; DZP, diazepam. Las medidas son expresadas como media± error estándar. *p<0,001 comparado con el valor del grupo tratado con DZP del criterio de 1min. **p<0,001 comparado con el valor del grupo tratado con SSN del criterio de 1min



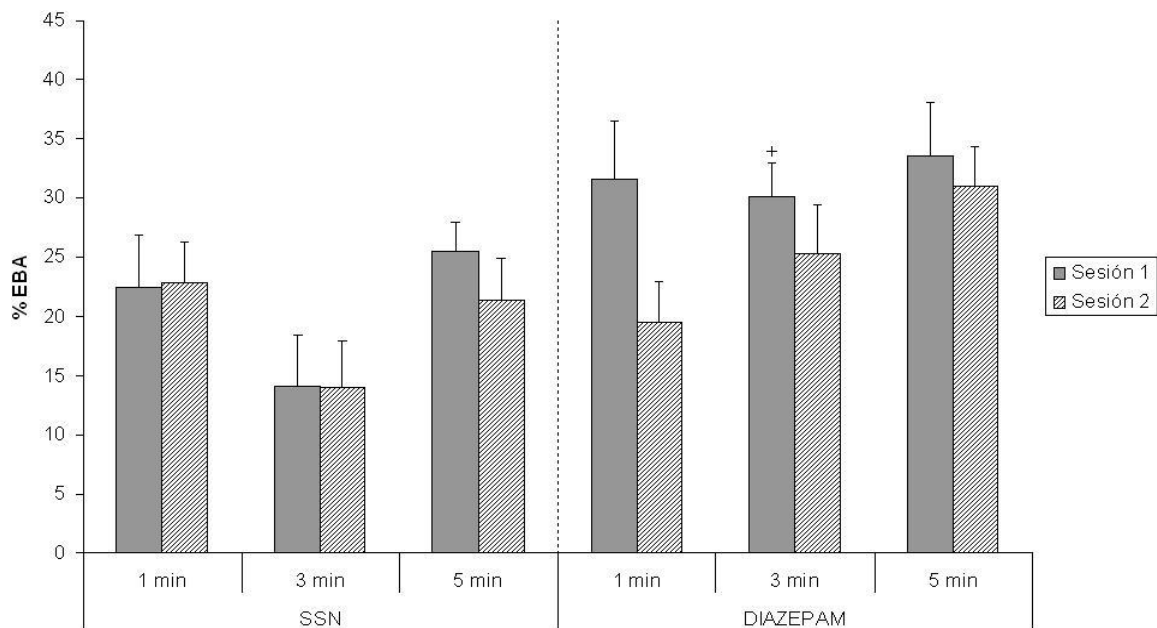
5.1.2 Porcentaje de Entradas a Brazo Abierto (%EBA)

Durante la sesión uno, el análisis de varianza de dos vías (tratamiento x criterio) reveló diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al tratamiento aplicado ($F(2,54)=11,666$, $p=0,001$), no encontrándose diferencias de acuerdo al criterio ($F(2,54)=1,802$, $p=0,175$), ni interacciones significativas entre los dos factores ($F(2,54)=0,575$, $p=0,566$). El análisis *post hoc* de Bonferroni mostró que dentro del criterio de 3min los animales tratados con DZP presentaban un %EBA mayor que los tratados con SSN (ver figura 11).

Durante la segunda sesión el análisis de varianza de dos vías (tratamiento y criterio), no reveló diferencias estadísticamente significativas ni de acuerdo a

criterio ($F(2,54)=1,758$, $p=0,182$) ni a tratamiento ($F(2,54)=3,895$, $p=0,054$). Al comparar los valores de %EBA de la segunda sesión con la primera, mediante t-test pareado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (Figura 11)

Figura 11. Comparación entradas relativas a brazo abierto (%EBA) de acuerdo a tratamiento, criterio de aprendizaje y sesión experimental. Las medidas son expresadas como media \pm error estándar. + $p=0,006$ comparado con valor de solución salina (SSN) del mismo criterio de 3min



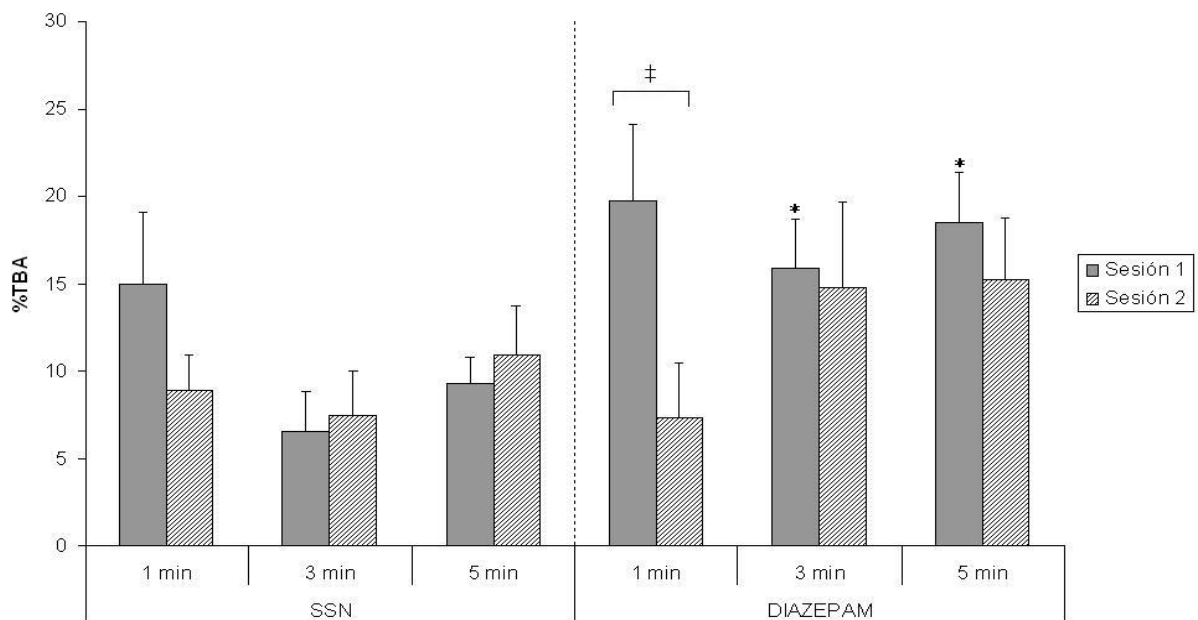
5.1.3 Porcentaje de Tiempo en Brazo Abierto (%TBA)

Durante la sesión uno el análisis de varianza de dos vías (tratamiento x criterio) reveló diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al tratamiento aplicado ($F(2,54)=8,986$, $p=0,004$), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al criterio ($F(2,54)=1,895$, $p=0,160$), ni interacciones significativas entre los dos factores ($F(2,54)=0,338$, $p=0,715$). El análisis *post hoc*

de Bonferroni mostró que los tratados con DZP presentaron un mayor %TBA que los tratados con SSN dentro del criterio de 3 y de 5min (Figura 12).

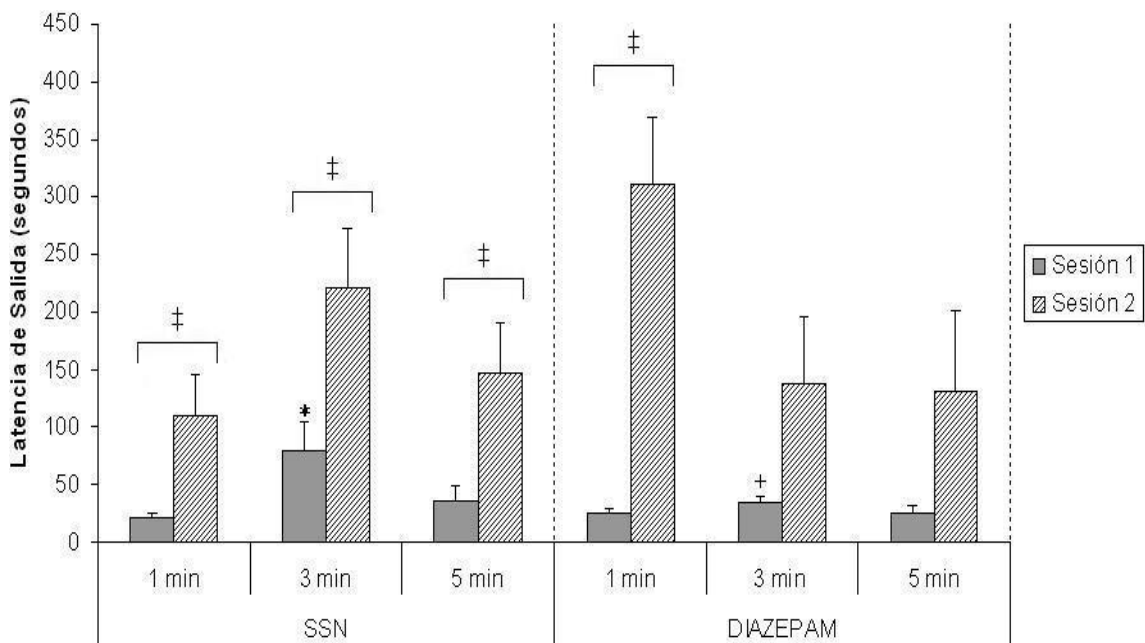
Durante la segunda sesión no se observaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a criterio ($F(2,54)=1,139$, $p=0,328$) o tratamiento ($F(2,54)=1,555$, $p=0,218$). Al comparar los valores de %TBA de la segunda sesión con la primera, se encontró una disminución significativa de esta variable en los animales que recibieron DZP en el criterio de 1min (Figura 12).

Figura 12. Comparación del tiempo relativo en brazo abierto (%TBA) de acuerdo a tratamiento, criterio de aprendizaje y sesión experimental. Las medidas son expresadas como media \pm error estándar. * $p<0,04$ comparado con el valor del grupo tratado con solución salina (SSN) del mismo Criterio de aprendizaje. ‡ $p=0,03$ entre valores de la sesión uno vs sesión dos.



5.1.4 Latencia De Salida A Brazo Abierto (LAT SALIDA)

Figura 13. Comparación de la latencia de salida a brazo abierto de acuerdo a tratamiento, criterio de aprendizaje y sesión experimental. Las medidas son expresadas como Media± error estándar. *p<0,002 comparado con el valor del grupo tratado con SSN del criterio de 1min. +p<0,01 comparado con el valor del grupo tratado con SSN del mismo criterio. ‡p=0,01 entre valores de la sesión uno vs sesión dos



Durante la sesión uno, el análisis de varianza de dos vías (tratamiento x criterio) reveló diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a criterio ($F(2,46)=5,608$, $p=0,007$), no encontrándose diferencias de acuerdo al tratamiento ($F(2,46)=4,032$, $p=0,051$), ni interacciones significativas entre los dos factores ($F(2,46)=2,811$, $p=0,071$). El análisis *post hoc* de Bonferroni mostró, dentro del grupo de animales tratados con SSN una mayor latencia de salida en aquellos pertenecientes al criterio de 3min al ser comparado con los animales del criterio de

1min ($p=0,002$). Así mismo, se encontró un aumento en la latencia de salida dentro del criterio de 3min en los tratados con SSN al ser comparado con los tratados con DZP ($p=0,006$).

Durante la segunda sesión no se observaron diferencias estadísticamente significativas por criterio ($F(2,50)=0,848$, $p=0,434$) o tratamiento ($F(2,50)=0,587$, $p=0,447$). Al comparar los valores de latencia de salida de la segunda sesión con la primera, se encontró un aumento significativo de esta variable en los animales que recibieron SSN en los criterios de 1, 3 y 5min (Figura 13). En los tratados con DZP solo se observó aumento en esta variable en el criterio de 1min ($p=0,004$) (Figura 13).

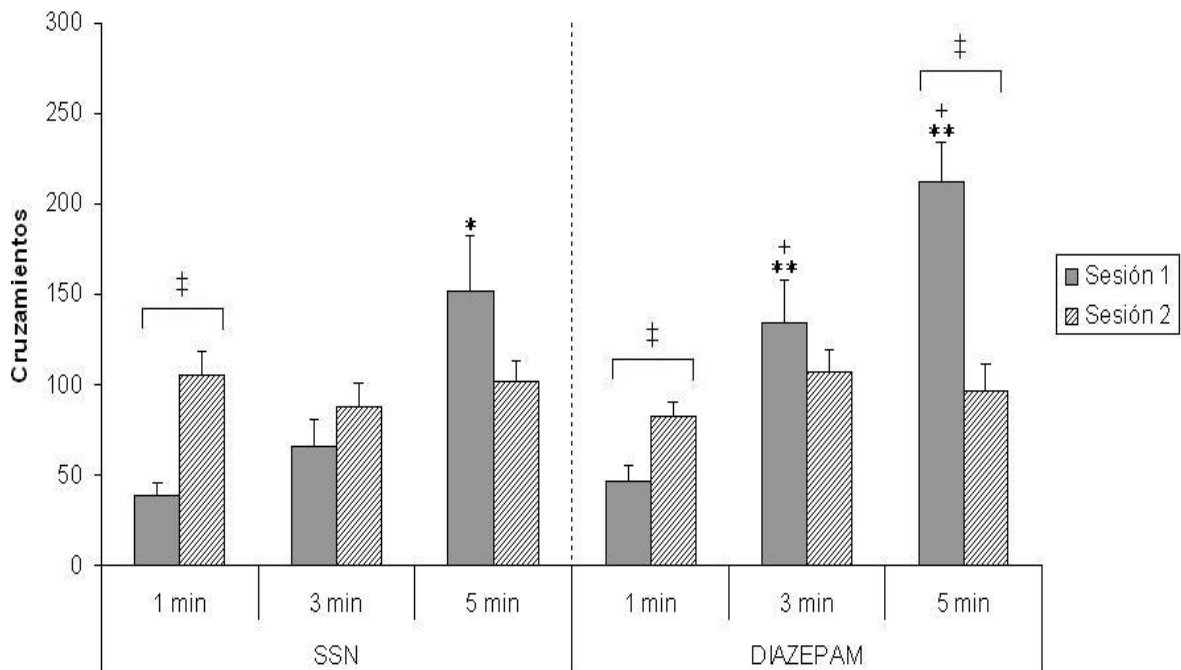
5.1.5 Cruzamientos

Durante la sesión uno el análisis de varianza de dos vías (tratamiento x criterio) reveló diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a criterio ($F(2,54)=25,546$, $p<0,001$) y tratamiento ($F(2,54)=7,987$, $p=0,007$), sin encontrarse interacciones significativas entre los dos factores ($F(2,54)=1.430$, $p=0,248$). El análisis *post hoc* de Bonferroni evidenció un mayor número de cruzamientos en los animales pertenecientes al criterio de 5min al ser comparados con los criterios de 3min y 1min dentro del grupo de SSN y DZP (Figura 14). Al realizar la comparación por tratamiento se encontró un mayor valor de cruzamientos en los animales tratados con DZP en comparación con aquellos que recibieron SSN (Figura 14).

Durante la segunda sesión el análisis de varianza de dos vías (tratamiento x criterio), no reveló diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a criterio ($F(2,54)=0,090$, $p=0,914$) o tratamiento ($F(2,54)=0,103$, $p=0,750$). Al comparar los valores de cruzamientos de la segunda sesión con la primera, se encontró un aumento significativo de esta variable en los animales que recibieron tanto SSN

como DZP en el criterio de 1min y una disminución en los cruzamientos en los tratados con DZP pertenecientes al criterio de 5min ($p < 0,001$) (Figura 14).

Figura 14. Comparación del número de cruzamientos de acuerdo a tratamiento, criterio de aprendizaje y sesión experimental. Las medidas son expresadas como media \pm error estándar. * $p < 0,001$ comparado con el valor del grupo tratado con solución salina (SSN) del criterio de 1min. ** $p < 0,01$ comparado con el valor del grupo tratado con diazepam (DZP) del criterio de 1min. + $p < 0,03$ comparado con el valor del grupo tratado con SSN del mismo criterio. ‡ $p < 0,01$ entre valores de la sesión uno vs sesión dos



5.1.6 Resultados Asociados a Lugares Discretos del Laberinto

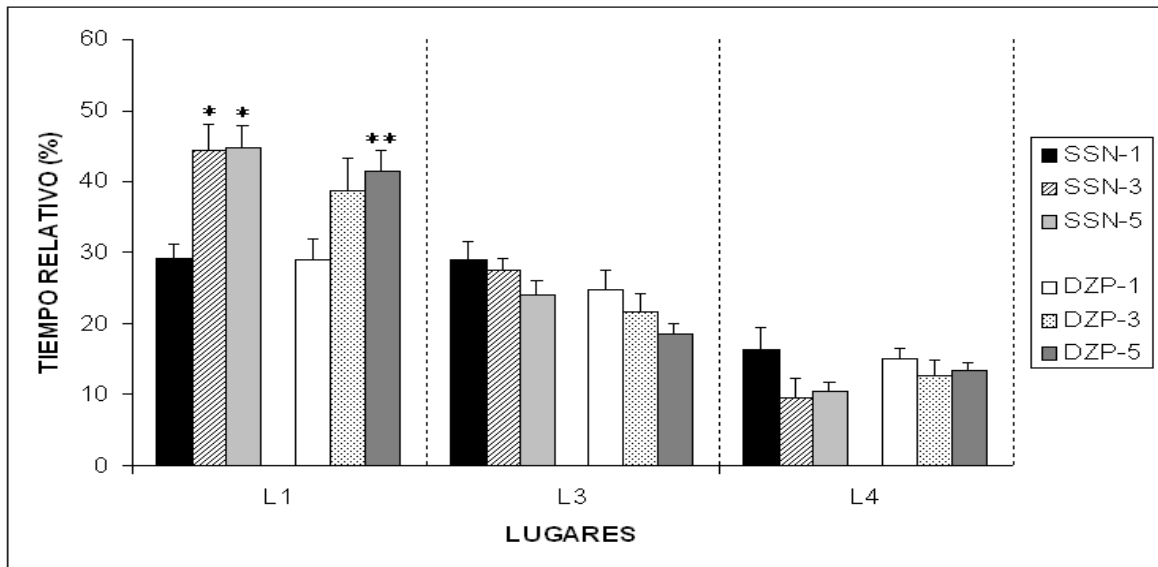
Para determinar si existían respuestas comportamentales diferenciadas asociadas con algunos lugares específicos del laberinto, se realizó un análisis de varianza de dos vías (Criterio x Tratamiento) para comparar el número relativo de entradas y el

tiempo relativo de permanencia en cada uno de estos lugares. El análisis por lugares se realizó tomando en cuenta la división virtual del LCE descrita previamente (ver figura 6).

Durante la primera sesión el análisis de varianza de dos vías (tratamiento x criterio) reveló diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de tiempo en el lugar 1 de acuerdo a criterio ($F(2,54)=10,568$, $p<0,001$), no encontrándose diferencias debido al tratamiento ($F(2,54)=1,198$, $p=0,279$), ni interacciones significativas entre los dos factores ($F(2,54)=0,337$, $p=0,715$). El análisis *post hoc* de Bonferroni mostró que dentro de los tratados con SSN las ratas con criterio de 3 y 5 min presentaron un mayor tiempo relativo en este lugar en comparación con las ratas con el criterio de 1min ($p<0,001$). De igual forma, las ratas tratadas con DZP y criterio de 5 min presentaron un mayor porcentaje de tiempo comparadas con las de 1 minuto ($p=0,033$) (Figura 15).

Fue observado también un efecto significativo del factor Tratamiento sobre el número relativo de entradas en brazos cerrados [(L1: $F(2,54)=7,943$, $p=0,007$); (L3: $F(2,54)=10,309$, $p=0,002$)], centro ($F(2,54)=4,303$, $p=0,043$) y brazos abiertos [(L5: $F(2,54)=11,307$, $p=0,001$); (L7: $F(2,54)=5,826$, $p=0,019$)]. Específicamente se observó un mayor número de entradas al lugar 1 en las ratas del grupo de SSN con criterio de 3min y al lugar 3 en las ratas de SSN con criterio de 1 y 5 min en comparación con las ratas tratadas con DZP. Por el contrario, se observaron menos entradas al centro y al lugar 5 en las ratas de SSN con criterio de 3 min y al lugar 7 en las ratas de SSN con criterio de 5 min en comparación con aquellas tratadas con DZP (Figura 16).

Figura 15. Comparación del tiempo relativo en los lugares 1, 3 (brazo cerrado); 4 (cetro); 5,6 y 7 (brazo abierto) de acuerdo a tratamiento y criterio de aprendizaje en la sesión uno. SSN-1, solución salina 1 minuto; SSN-3, solución salina 3 minutos; SSN-5, solución salina 5 minutos; DZP-1, diazepam 1 minuto; DZP-3, diazepam 3 minutos; DZP-5, diazepam 5 minutos. Los valores están expresados como el valor medio \pm error estándar. * $p < 0,001$ comparado con el valor del grupo tratado con SSN con criterio de 1min; ** $p < 0,05$ comparado con el valor del grupo tratado con DZP con criterio de 1 min, + $p < 0,01$ comparado con el valor de los tratados con DZP de igual criterio.



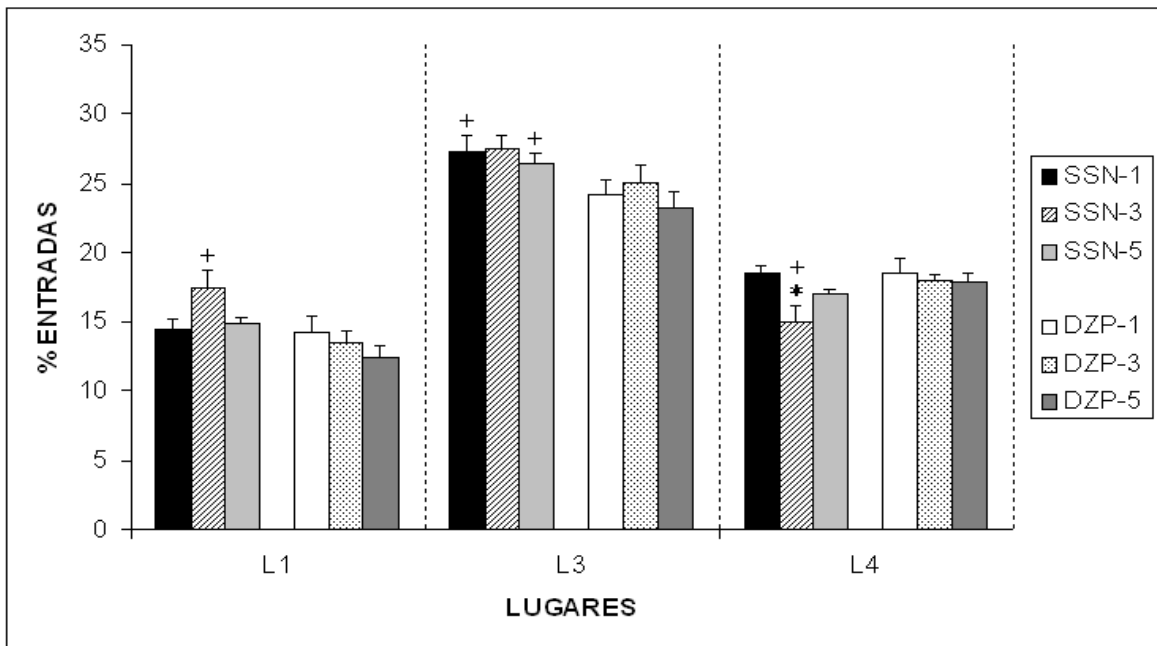
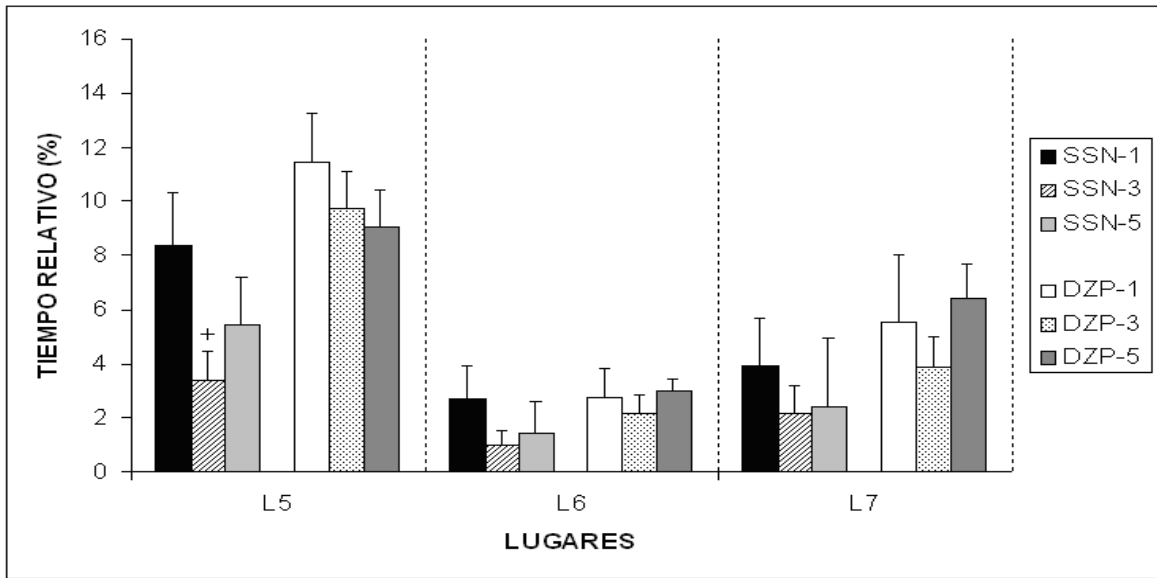
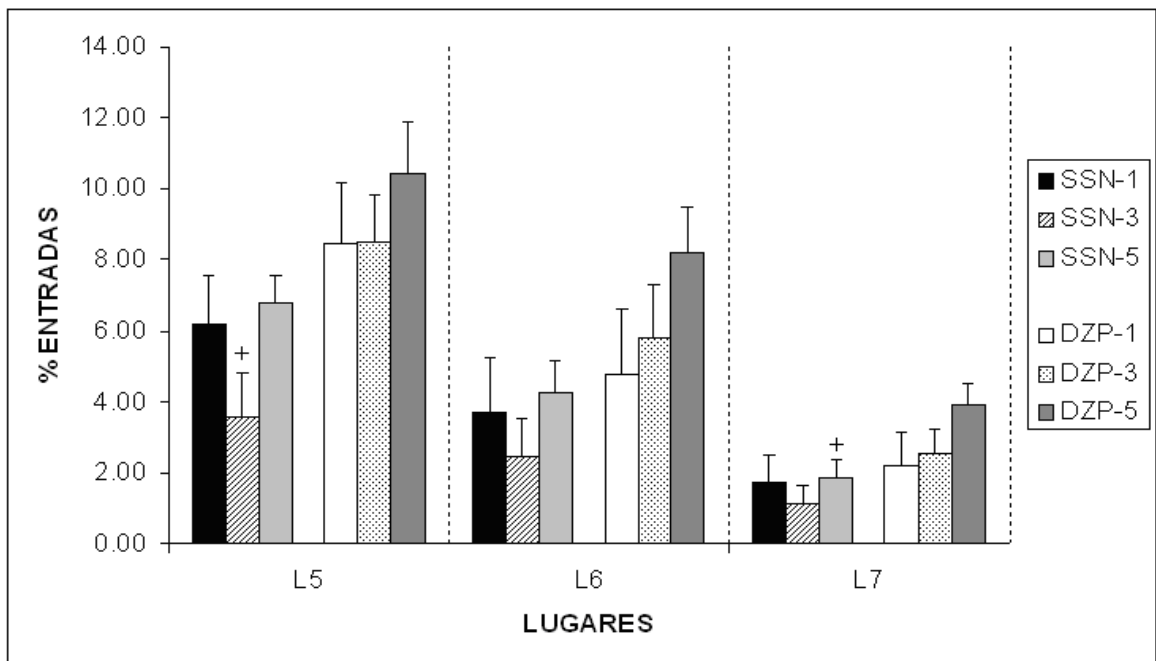


Figura 16. Comparación de las entradas relativas a los lugares 1, 3 (brazo cerrado); 4 (centro); 5, 6 y 7 (brazo abierto) de acuerdo a tratamiento y criterio de aprendizaje en la sesión uno. SSN-1, solución salina 1 minuto; SSN-3, solución salina 3 minutos; SSN-5, solución salina 5 minutos; DZP-1, diazepam 1 minuto; DZP-3, diazepam 3 minutos; DZP-5, diazepam 5 minutos. Los valores están expresados como media \pm error estándar. * $p < 0,001$ comparado con el valor del grupo tratado con SSN del criterio de 1min. + $p < 0,01$ comparado con el valor de los tratados con DZP del mismo criterio



En la segunda sesión no se observaron diferencias significativas en tiempo relativo (Figura 17), sin embargo, se observó un menor valor relativo de entradas al lugar 7 en las ratas del grupo de SSN 5min en comparación con el grupo de DZP del mismo criterio (Figura 18).

Figura 17. Comparación del tiempo relativo en los lugares 1, 3 (brazo cerrado); 4 (centro); 5,6 y 7 (brazo abierto) de acuerdo a tratamiento y criterio de aprendizaje en la sesión dos. SSN-1, solución salina 1 minuto; SSN-3, solución salina 3 minutos; SSN-5, solución salina 5 minutos; DZP-1, diazepam 1 minuto; DZP-3, diazepam 3 minutos; DZP-5, diazepam 5 minutos. Los valores están expresados como el valor medio \pm error estándar

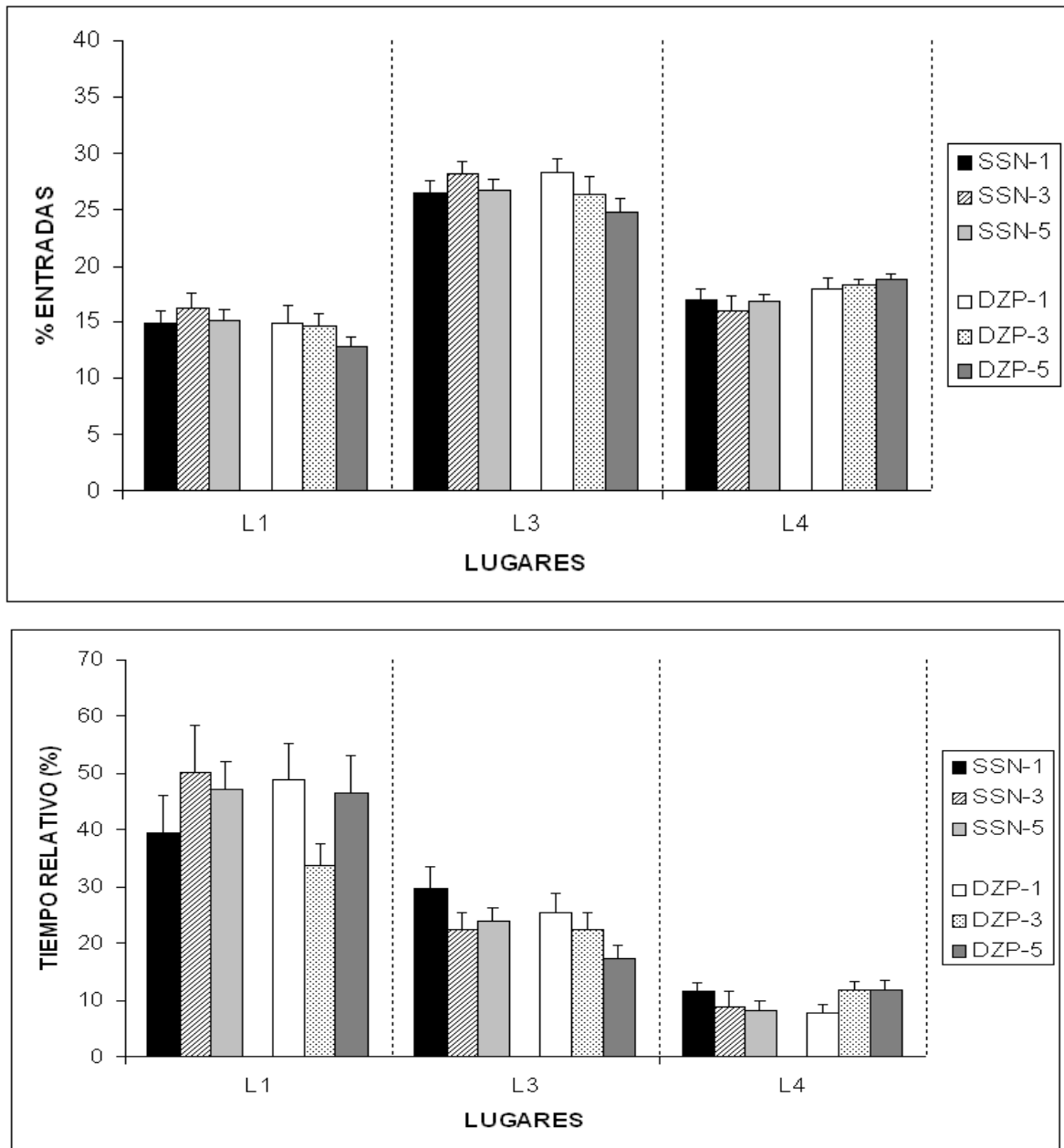
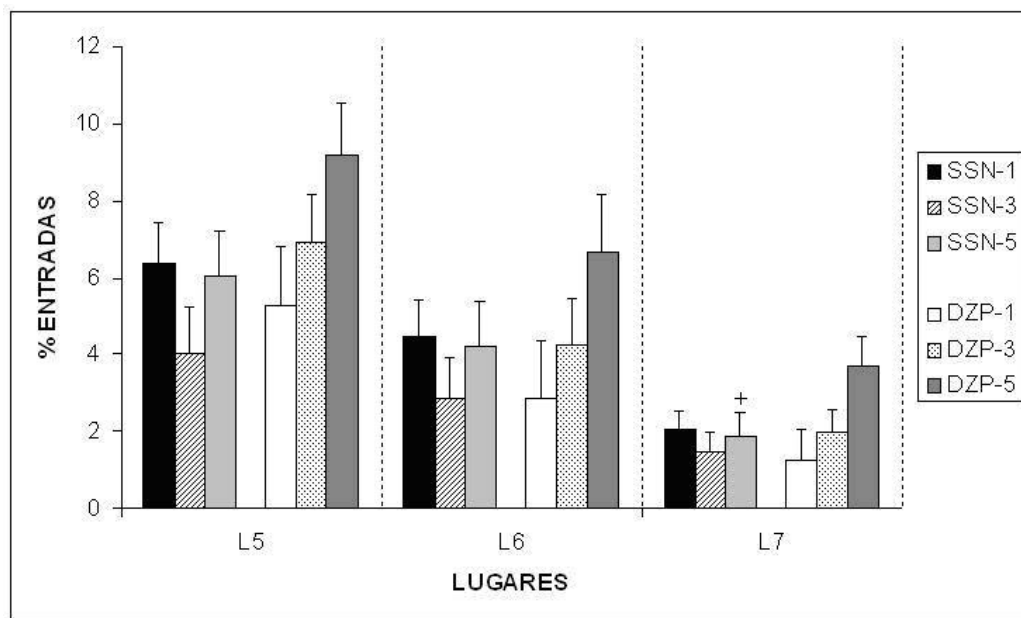
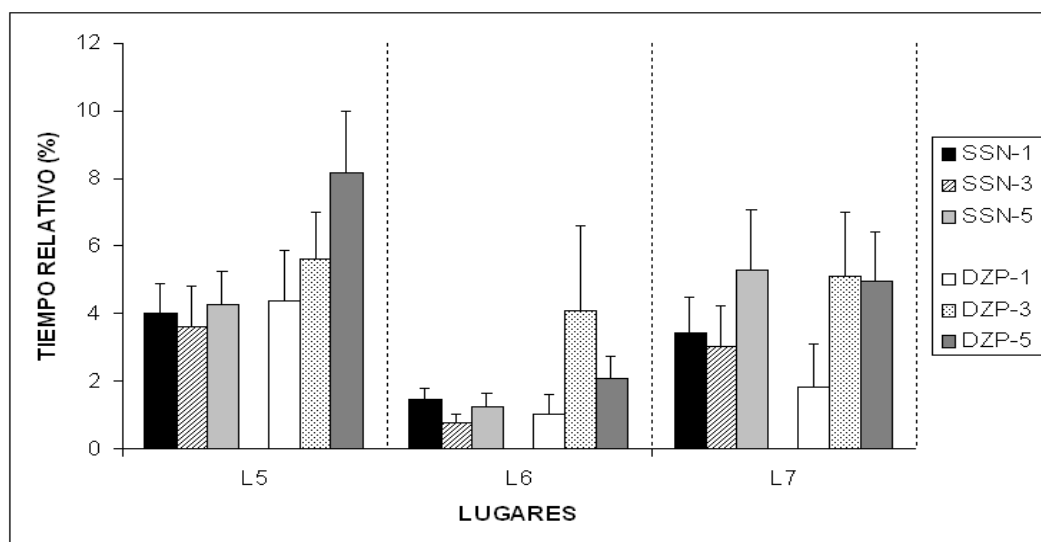


Figura 18. Comparación de las entradas relativas a los lugares 1, 3 (brazo cerrado); 4 (centro); 5, 6 y 7 (brazo abierto) de acuerdo a tratamiento y criterio de aprendizaje en la sesión dos. SSN-1, solución salina 1 minuto; SSN-3, solución salina 3 minutos; SSN-5, solución salina 5 minutos; DZP-1, diazepam 1 minuto; DZP-3, diazepam 3 minutos; DZP-5, diazepam 5 minutos. Los valores están expresados como el valor medio \pm error estándar. $+p<0,05$ comparado con el valor de los tratados con DZP del mismo criterio



5.1.7 Evolución Temporal De Las Variables Comportamentales Evaluadas

Se graficó el comportamiento a lo largo del tiempo de las variables entradas y tiempo acumulado en algunos lugares discretos del LCE. Tanto en sesión uno como en sesión dos, los valores de estas variables se graficaron de acuerdo al tratamiento y criterio de aprendizaje cada 30 segundos. Los lugares seleccionados para este análisis fueron L1 (fondo de brazo cerrado) y L7 (fondo de brazo abierto) por corresponder a los lugares con mayor peso emocional y L4 (centro) por ser el lugar en el cual los animales realizan la evaluación del riesgo.

En las ratas con criterio de 1 min no fueron observadas diferencias significativas debidas al tratamiento en la evolución temporal del número de entradas o el tiempo acumulado en los lugares evaluados durante primera o segunda sesión (Figura 19 y 20). En las ratas con criterio de 3 min se evidenció un aumento significativo en el número de entradas a los lugares 4 y 7 en aquellas ratas tratadas con DZP tan temprano como a los 90 segundos de iniciada la sesión y hasta aproximadamente el minuto 8 de la prueba (Figura 21). Aunque no se evidenció un comportamiento diferencial de estas variables en segunda sesión, sí fue observado un incremento significativo en el tiempo de permanencia en el lugar 1 en las ratas tratadas con SSN (Figura 22). Por último, en las ratas de criterio de 5 min, se observaron diferencias significativas en la evolución temporal del número de entradas en todos los lugares evaluados, y en el tiempo acumulado en los lugares 4 y 7 entre las ratas tratadas con DZP y SSN (Figura 23 y 24), observándose una tendencia de las ratas tratadas con DZP a permanecer en los lugares considerados con mayor carga emocional (L4, L7) desde los 3 hasta los 5 minutos de iniciada la prueba. Adicionalmente, en las ratas tratadas con DZP se observó un aumento en el tiempo de permanencia en el lugar 7, durante la sesión dos en la fase inicial de la prueba.

Figura 19. Evolución de las entradas acumuladas en el tiempo en los lugares 1, 4 y 7 durante la primera y segunda sesión de las ratas con criterio de 1 min tratadas con solución salina normal (SSN) o diazepam (DZP)

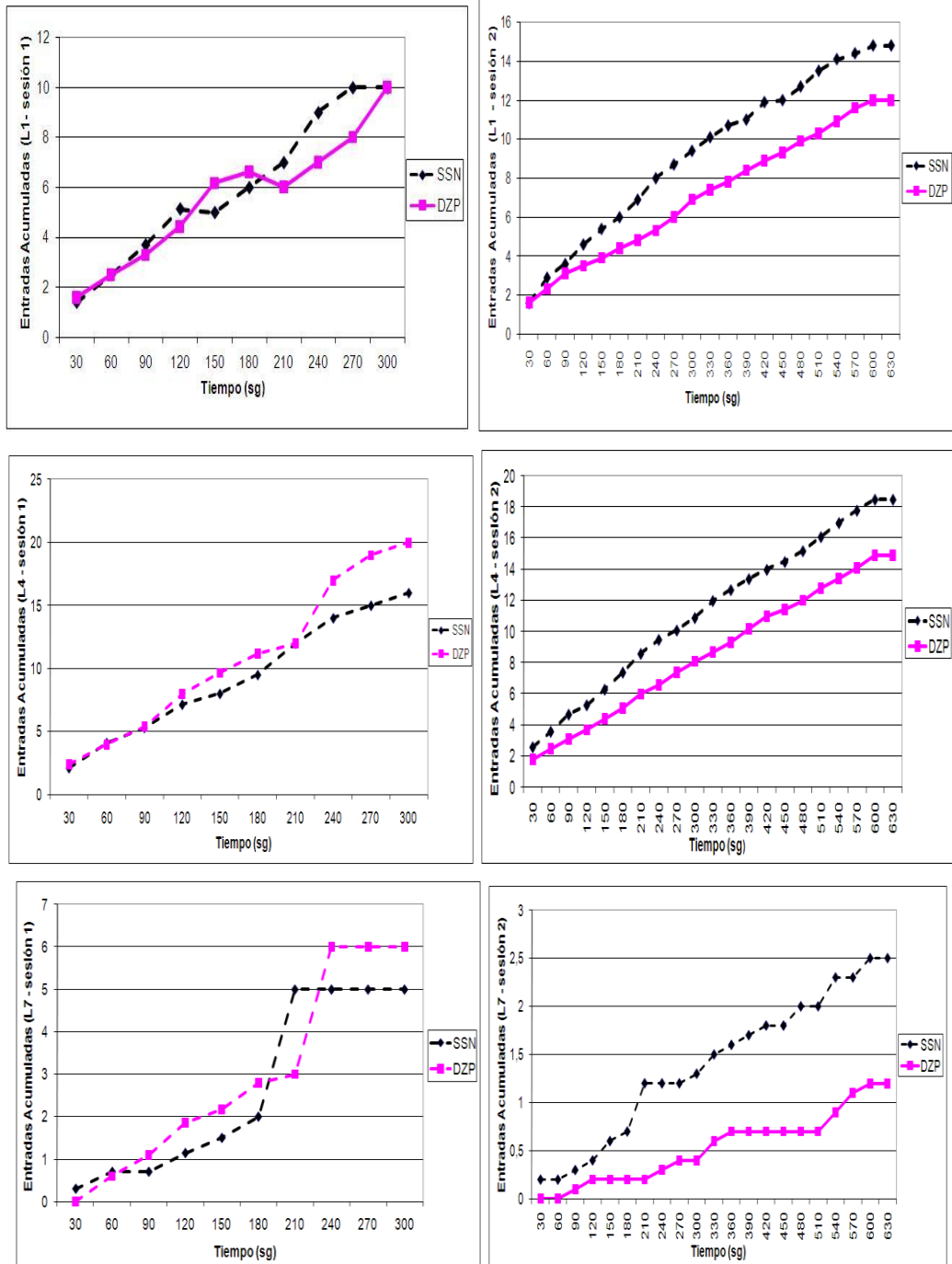


Figura 20. Evolución del tiempo acumulado en los lugares 1, 4 y 7 durante la primera y segunda sesión de las ratas con criterio de 1 min tratadas con solución salina normal (SSN) o diazepam (DZP)

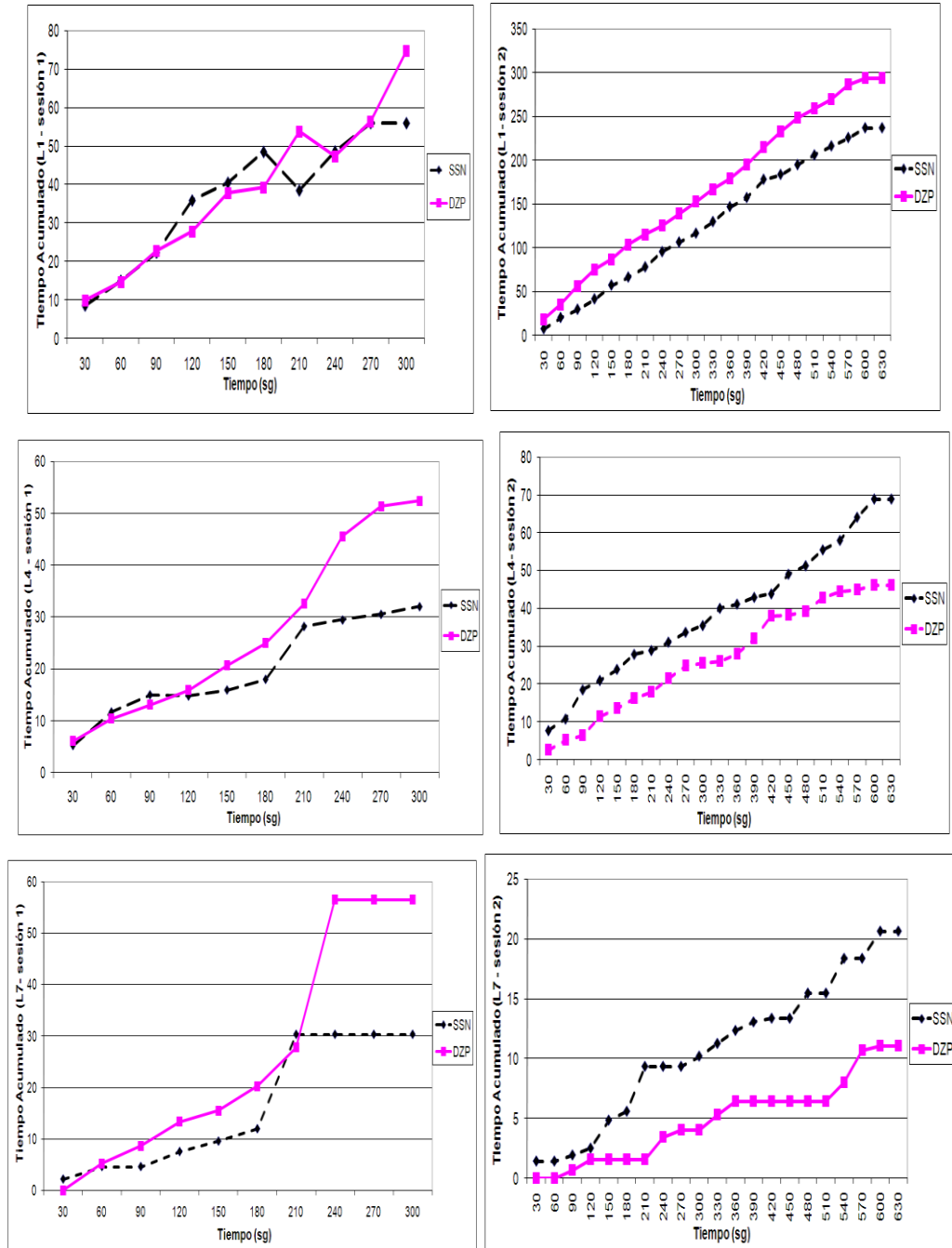


Figura 21. Evolución de las entradas acumuladas en el tiempo en los lugares 1, 4 y 7 durante la primera y segunda sesión de las ratas con criterio de 3 min tratadas con solución salina normal (SSN) o diazepam (DZP). *p<0,05 entre SSN y DZP

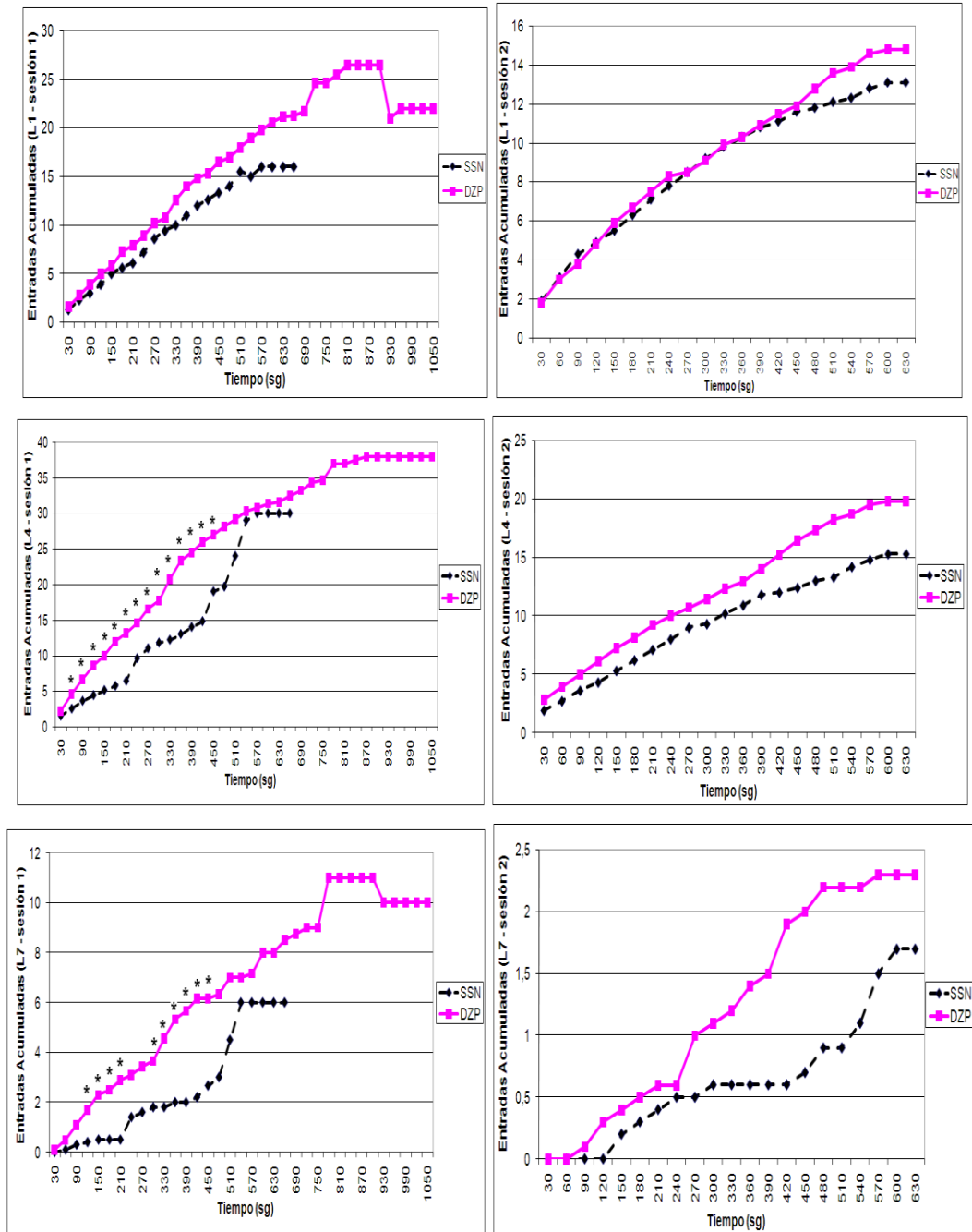


Figura 22. Evolución del tiempo acumulado en los lugares 1, 4 y 7 durante la primera y segunda sesión de las ratas con criterio de 3 min tratadas con solución salina normal (SSN) o diazepam (DZP). *p<0,05 entre SSN y DZP

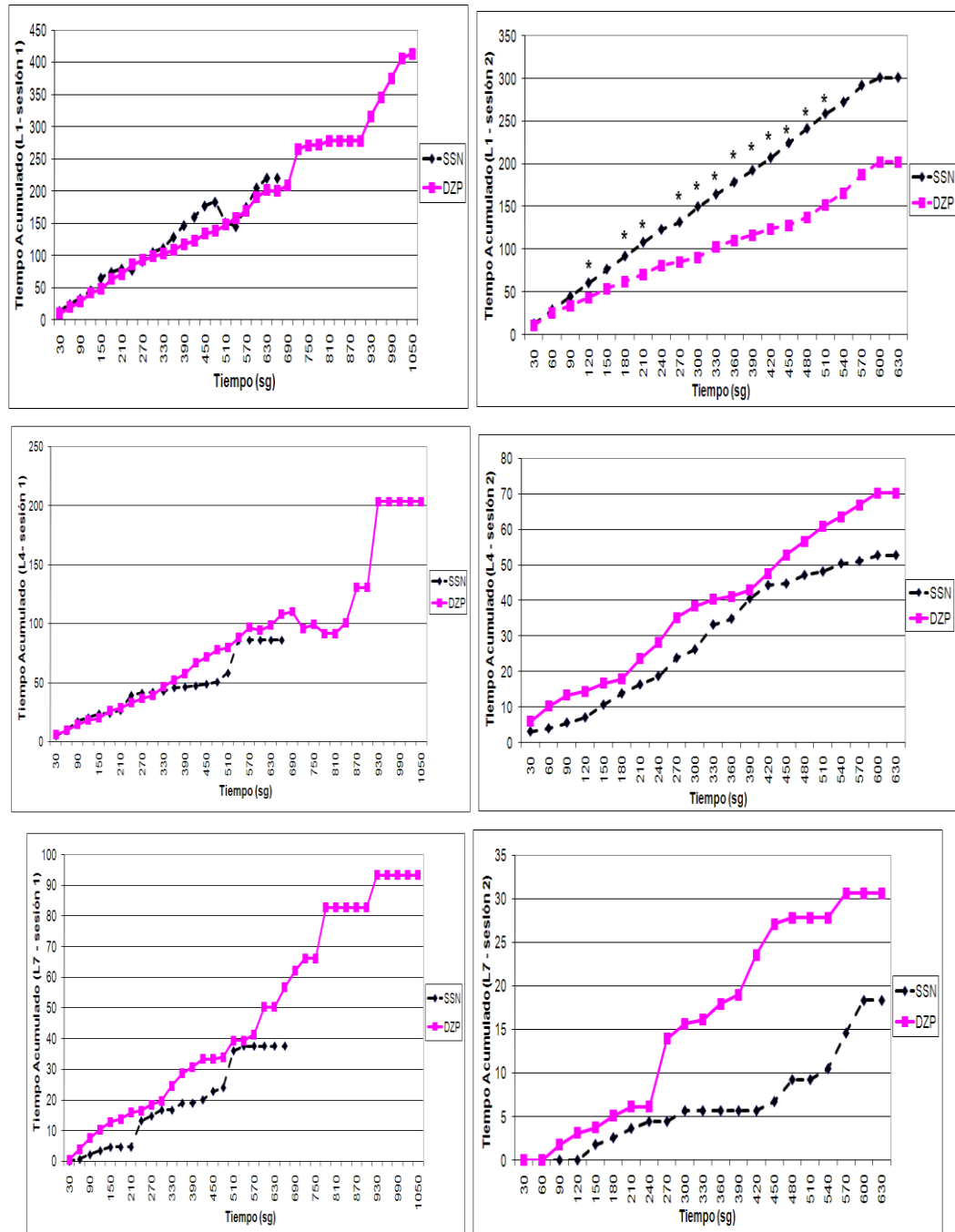


Figura 23. Evolución de las entradas acumuladas en el tiempo en los lugares 1, 4 y 7 durante la primera y segunda sesión de las ratas con criterio de 5 min tratadas con solución salina normal (SSN) o diazepam (DZP). *p<0,05 entre SSN y DZP

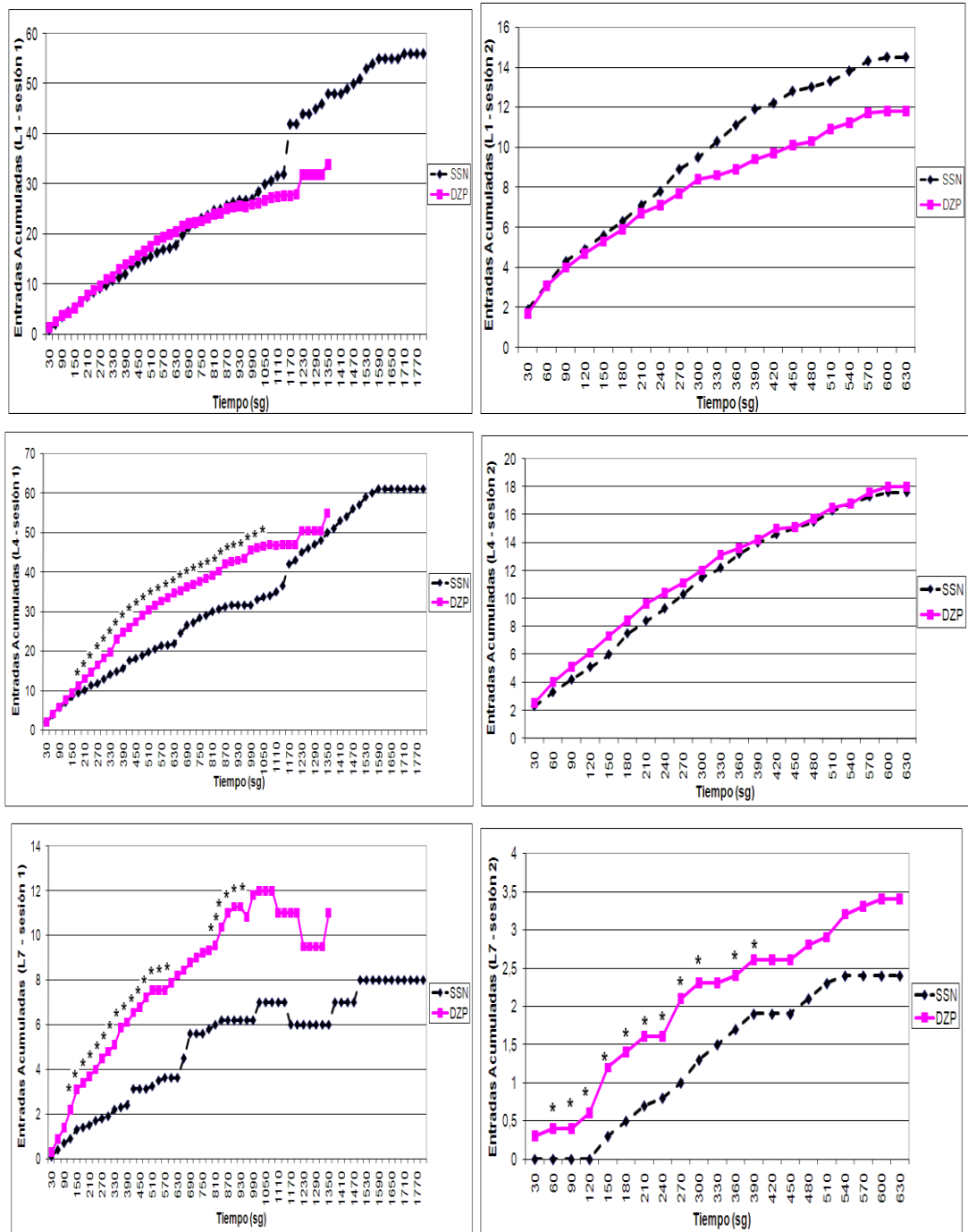
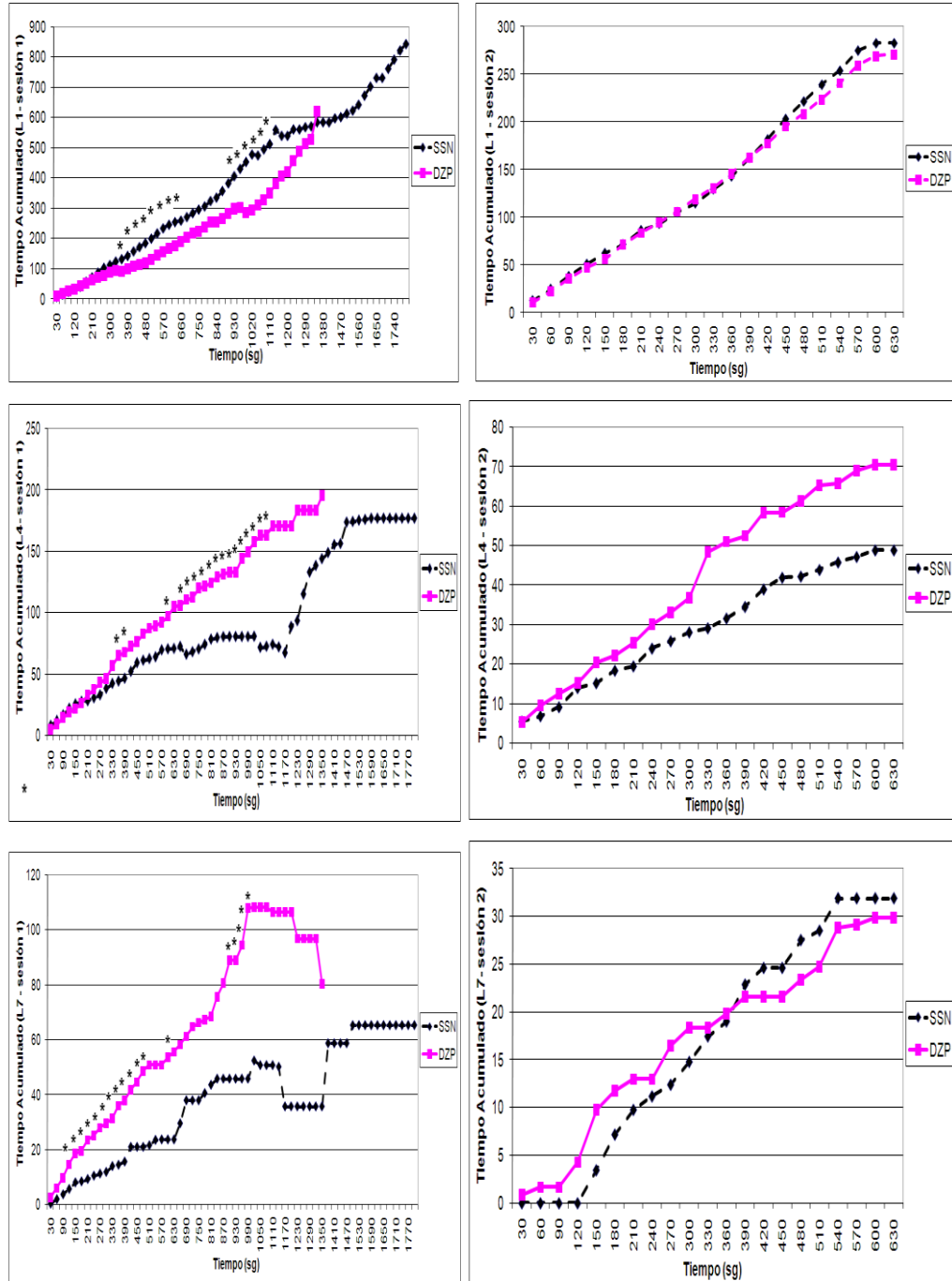


Figura 24. Evolución del tiempo acumulado en los lugares 1, 4 y 7 durante la primera y segunda sesión de las ratas con criterio de 5 min tratadas con solución salina normal (SSN) o diazepam (DZP). *p<0,05 entre SSN y DZP

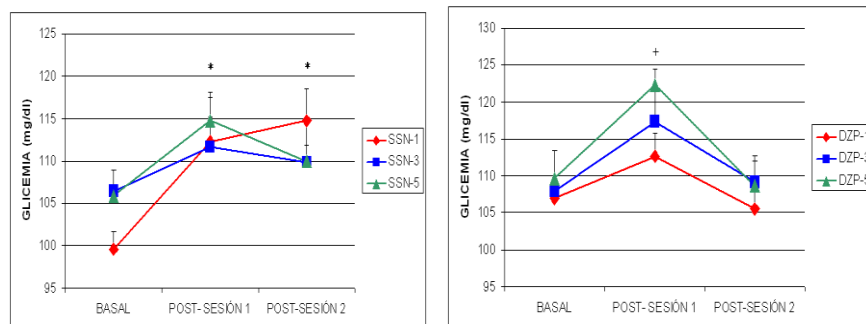


5.1.8 Impacto de los Criterios de Aprendizaje Sobre los Niveles de Glicemia de Ratas Wistar-UIS

Con el objetivo de evaluar posibles diferencias en los niveles de glicemia basales en los grupos evaluados, se llevó a cabo un análisis de varianza de dos vías (tratamiento y criterio) de los niveles de glicemia previos a la exposición al LCE (48h antes). El ANOVA de dos vías no reveló diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a criterio ($F(2,54)=1,069$, $p=0,350$), tratamiento ($F(2,54)=2,336$, $p=0,132$), o interacciones estadísticamente significativas entre los dos factores ($F(2,54)=0,377$, $p=0,688$).

Adicionalmente, se analizaron los valores de glicemia posteriores a la exposición de los animales al LCE en la primera y segunda sesión del protocolo de experimentación. En este análisis no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al tratamiento [($F(2,54)=2,090$, $p=0,154$); ($F(2,54)=1,471$, $p=0,230$)], criterio [($F(2,54)=1,346$, $p=0,269$); ($F(2,54)=0,0294$, $p=0,971$)], o interacciones significativas entre los factores [($F(2,54)=0,486$, $p=0,618$); ($F(2,54)=0,836$, $p=0,439$)].

Figura 25. Comparación de los niveles de glicemia (mg/dL) post-sesiones experimentales de acuerdo a criterio de aprendizaje y tratamiento. Las medidas son expresadas como Media± error estándar. * $p<0,05$ comparado con el valor basal de la glicemia (grupo SSN-1min). + $p<0,05$ comparado con el valor basal de glicemia (grupo DZP-5min)



Al analizar por medio de t-test, los cambios de glicemia ocurridos dentro de cada grupo, como consecuencia de la exposición a las dos fases de experimentación, se evidenció un aumento significativo de los valores de glicemia en el grupo tratado con SSN y criterio de 1 min después de las sesiones 1 y 2 ($p=0,002$ y $p=0,002$) y en el grupo de DZP de 5 min después de la sesión 1 ($p=0,008$) (Figura 25).

5.1.9 Correlación entre Manifestaciones Comportamentales de Ansiedad y Niveles de Glicemia

Los resultados de los análisis de correlación entre los niveles de glicemia post-sesión uno y las variables comportamentales de esta misma sesión mostraron una correlación positiva significativa entre los niveles de glicemia del grupo de ratas con criterio de 3 min y SSN con el tiempo y frecuencia relativa de entradas a los lugares 6 y 7 de los brazos abiertos durante la primera sesión (Tabla 3). Por el contrario, en el grupo de ratas de 5 min y SSN fue observada una relación inversa entre los niveles de glicemia y el tiempo y la frecuencia relativa de entradas a los lugares 6 y 7, junto con una asociación positiva con el tiempo y frecuencia relativa de entradas al lugar 3 en la primera sesión (Tabla 3). No fueron observadas correlaciones significativas entre los valores de glicemia y las variables comportamentales en los otros grupos evaluados.

En relación a la asociación entre valores de glicemia post-1ª sesión y las variables comportamentales de la segunda sesión se observó una correlación negativa significativa entre la glicemia del grupo de SSN con criterio de 5 min y la frecuencia relativa de entradas en los lugares 6 y 7 y una correlación positiva con la frecuencia de entradas al lugar 3 (Tabla 4).

Tabla 3. Coeficientes de correlación entre los niveles de glicemia post sesión 1 y las variables comportamentales de la sesión 1 en el LCE de acuerdo al criterio y tratamiento utilizados

VARIABLES SESION 1	COEFICIENTE					
	SSN			DZP		
	1 MIN	3 MIN	5 MIN	1 MIN	3 MIN	5 MIN
% Tiempo en brazo cerrado	-0,19	-0,62	0,2	-0,14	-0,01	-0,56
% Tiempo en brazo abierto	0,04	0,56	-0,48	0,18	-0,09	0,4
% Tiempo en el centro	0,17	0,37	0,18	-0,12	0,14	0,53
% Entradas brazo abierto	0,02	0,71*	-0,42	0,23	0,06	0,51
% Entradas brazo cerrado	-0,02	-0,71*	0,42	-0,23	-0,06	-0,51
% Tiempo lugar 1	0,11	-0,54	-0,49	-0,01	-0,26	-0,2
% Tiempo lugar 2	0,23	-0,05	0,45	-0,44	0,3	-0,6
% Tiempo lugar 3	-0,5	-0,05	0,66*	0,18	0,19	-0,55
% Tiempo lugar 4	0,17	0,37	0,18	-0,12	0,14	0,63
% Tiempo lugar 5	0,07	0,61	-0,16	0,04	-0,33	0,49
% Tiempo lugar 6	0,22	0,67*	0,03	0,14	0,29	0,46
% Tiempo lugar 7	-0,04	0,71*	-0,74*	0,22	-0,07	0,2
% Frecuencia lugar 1	-0,05	-0,33	0,53	-0,26	-0,03	-0,56
% Frecuencia lugar 2	0,04	-0,45	0,58	-0,19	-0,01	-0,51
% Frecuencia lugar 3	-0,23	-0,66	0,73*	0,06	-0,06	-0,35
% Frecuencia lugar 4	0,05	0,08	0,33	0,08	-0,4	0,61
% Frecuencia lugar 5	0,08	0,64*	-0,56	0,13	0,1	0,49
% Frecuencia lugar 6	0,06	0,65*	-0,75*	0,13	0,11	0,38
% Frecuencia lugar 7	0,01	0,67*	-0,78*	0,18	0,04	0,38
Cruzamientos	0,1	0,39	-0,58	0,27	0,16	0,17
Latencia lugar 5	-0,35	0,29	0,36	-0,16	0,3	-0,16

SSN, solución salina normal; DZP, diazepam. *p<0,05.

Tabla 4. Coeficientes de correlación entre los niveles de glicemia post sesión 1 y las variables comportamentales de la sesión 2 en el LCE de acuerdo al criterio y tratamiento utilizados

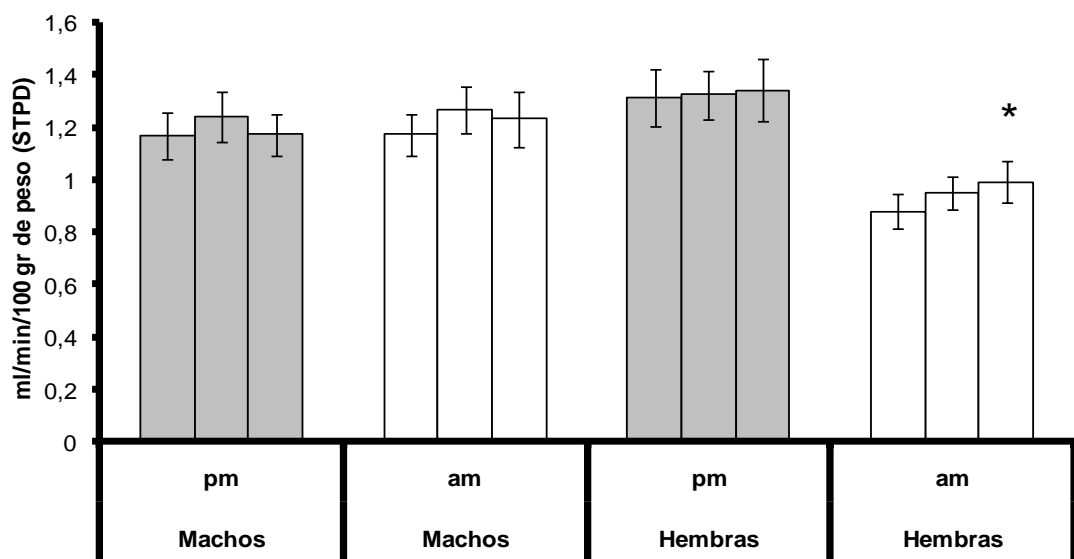
VARIABLES SESION 2	COEFICIENTE					
	SSN			DZP		
	1 MIN	3 MIN	5 MIN	1 MIN	3 MIN	5 MIN
% Tiempo en brazo cerrado	0,59	-0,36	0,6	0,5	-0,03	-0,17
% Tiempo en brazo abierto	-0,52	0,18	-0,53	-0,34	-0,24	0,17
% Tiempo en el centro	-0,57	0,22	-0,48	-0,19	0,26	0,15
% Entradas brazo abierto	-0,31	0,44	-0,43	-0,34	-0,25	0,26
% Entradas brazo cerrado	0,31	-0,44	0,43	0,34	0,25	-0,26
% Tiempo lugar 1	0,16	-0,13	0,44	0,28	-0,07	-0,06
% Tiempo lugar 2	-0,08	-0,24	-0,16	-0,35	0,26	0,02
% Tiempo lugar 3	0,24	-0,11	0,17	-0,23	0,48	-0,23
% Tiempo lugar 4	-0,57	0,22	-0,48	-0,19	0,26	0,15
% Tiempo lugar 5	-0,58	0,13	-0,41	-0,5	-0,28	0,25
% Tiempo lugar 6	0,03	0,4	-0,25	-0,3	-0,07	0,002
% Tiempo lugar 7	-0,52	0,57	-0,57	-0,03	-0,13	0,09
% Frecuencia lugar 1	0,46	-0,1	0,5	0,28	-0,09	-0,17
% Frecuencia lugar 2	0,62	0,19	0,55	0,17	0,08	-0,24
% Frecuencia lugar 3	0,16	0,53	0,61*	-0,41	0,21	-0,33
% Frecuencia lugar 4	-0,54	-0,1	-0,27	-0,48	-0,12	-0,11
% Frecuencia lugar 5	-0,39	0,49	-0,46	-0,53	-0,23	0,24
% Frecuencia lugar 6	-0,39	0,52	-0,63*	-0,06	-0,01	0,31
% Frecuencia lugar 7	-0,47	0,47	-0,76*	-0,06	0,03	0,22
Cruzamientos	-0,37	-0,01	-0,43	-0,42	0,17	-0,12
Latencia lugar 5	0,59	-0,44	0,31	0,26	0,03	0,01

SSN, solución salina normal; DZP, diazepam. *p<0,05.

5.1.10 Fase 2.1 Consumo De Oxígeno Por Horario Y Sexo En Ratas WISTAR-UIS

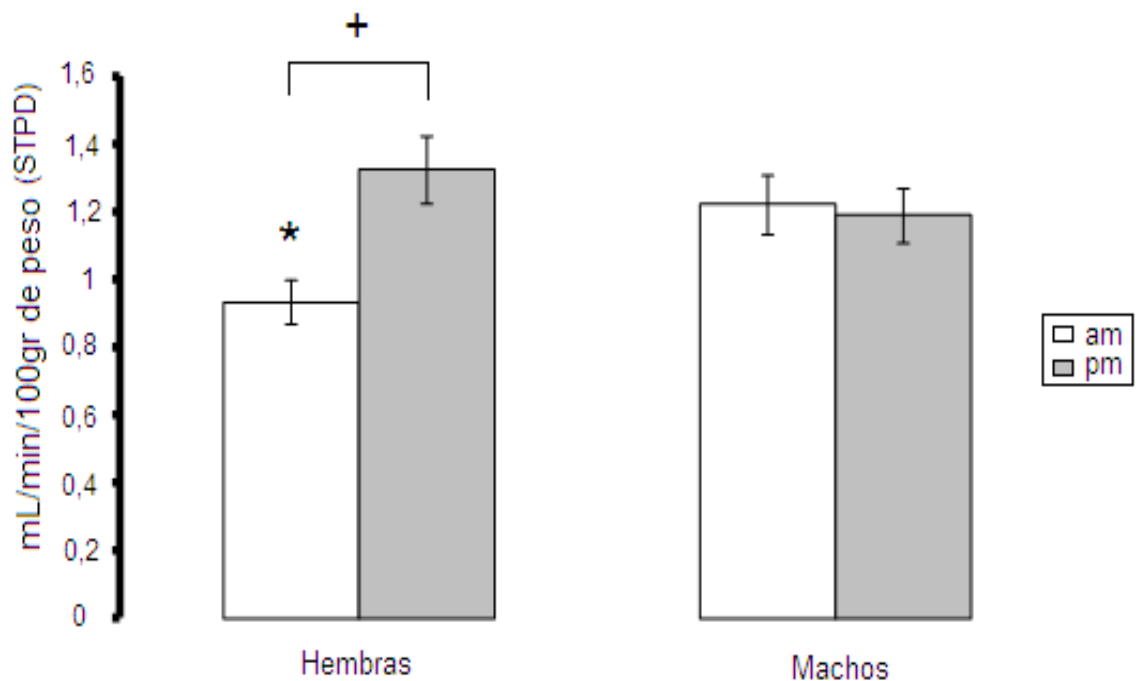
Un análisis de varianza de una vía para medidas repetidas dentro de cada grupo experimental, mostró que no hubo diferencias significativas entre las tres medidas de consumo de oxígeno realizadas en el grupo de machos en horas de la mañana ($F(2,32):2,601$, $p=0,09$) o de la tarde ($F(2,32):0,907$, $p=0,414$), ni dentro de las medidas registradas para las hembras en la tarde ($F(2,18):0,0982$, $p=0,907$); no obstante, en el grupo de hembras evaluadas en la mañana, se encontró una diferencia significativa ($F(2,18):4,405$, $p=0,028$), donde la prueba Holm-Sidak para comparaciones múltiples corregidas, indicó que la última evaluación (medida 3) fue significativamente mayor que la primera evaluación (medida 1) (figura 26).

Figura 26. Comparación del consumo de oxígeno de acuerdo al sexo y horario de evaluación. Promedio \pm un error estándar de las medidas repetidas del consumo de oxígeno en condiciones estándar (STPD) por 100 gramos de peso de los animales para cada grupo experimental. *($p<0,05$) comparación de tercera con primera medida dentro del grupo del mismo sexo y horario de evaluación.



El análisis de varianza de dos factores (género x horario) mostró diferencias significativas atribuibles a la interacción de los dos factores ($F(1,50):5,318$, $p=0,025$), no habiendo diferencias significativas por horario ($F(1,50):3,875$, $p=0,055$), ni por sexo ($F(1,50):0,694$, $p=0,409$). Las comparaciones múltiples corregidas, indicaron un menor consumo de oxígeno en las hembras durante la mañana en comparación con los machos evaluados en la mañana y las hembras evaluadas en la tarde (Fig. 27).

Figura 27. Consumo de oxígeno (STPD) de acuerdo al sexo y horario. Promedio \pm un error estándar del consumo de oxígeno en condiciones STPD en mL/min/100gr de peso, en cada grupo experimental. * $p<0,05$ comparado con los machos evaluados en la mañana. + $p<0,05$ mañana comparada con tarde en el mismo sexo



5.1.11 Fase 2.2 Correlación entre Consumo de Oxígeno Basal y Post-Aplicación de Adrenalina y Manifestaciones Comportamentales de Ansiedad

Con el objetivo de señalar posibles diferencias en el consumo de oxígeno debidas a la aplicación de adrenalina, se llevó a cabo un análisis de t test pareado del promedio pre-adrenalina con el promedio post-adrenalina, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($t:1,32, p=0,2$).

Posteriormente se realizó un análisis de correlación de las variables comportamentales de la sesión experimental con el promedio de las tres mediciones de consumo de oxígeno pre y post-aplicación de adrenalina y el delta del promedio post-adrenalina en relación al valor basal. En estos análisis fue incluida además la tercera medida de consumo de oxígeno previa a la aplicación de adrenalina ya que se consideró que en ese momento las ratas presentaban un mayor nivel de estrés debido a una mayor manipulación y tiempo de confinamiento en el dispositivo.

El análisis con el promedio de las tres medidas pre-adrenalina con las variables comportamentales de la sesión uno, mostró correlación significativa negativa con el tiempo en el lugar 1. Por su parte, el promedio de las tres medidas post-adrenalina y el delta del promedio de las medidas pre y post aplicación de adrenalina, no mostraron correlaciones significativas con ninguna de las variables evaluadas (Tabla 3). Los resultados de los análisis de la medida tres de consumo de oxígeno pre-adrenalina con las variables comportamentales de la sesión uno mostraron correlaciones significativas negativas con el porcentaje de entradas al brazo cerrado y el tiempo en el lugar 1 del LCE, mientras que se encontró una correlación positiva con el porcentaje de entradas y tiempo en el brazo abierto (Tabla 5). Los resultados de correlación del consumo de oxígeno y las variables comportamentales de la segunda sesión fueron similares a los observados con la primera sesión (Tabla 6).

Tabla 5. Coeficientes de correlación entre el consumo de oxígeno (VO₂) y variables comportamentales de la sesión uno en el LCE

Variables Sesión 1	COEFICIENTE			
	M3- PRE –ADR	PROM PRE-ADR	PROM POST-ADR	DELTA (PRE-POST)
% tiempo brazo cerrado	-0,62	-0,35	0,06	-0,30
% tiempo brazo abierto	0,72*	0,36	-0,13	0,36
% tiempo en el centro	0,48	0,30	-0,01	0,22
% Entradas Brazo		0,47	-0,07	0,39
Abierto	0,76*			
% Entradas Brazo		-0,47	0,07	-0,39
Cerrado	-0,76*			
Latencia Salida	0,05	0,23	-0,59	0,50
Cruzamientos	0,62	0,44	0,01	0,30
Entradas Lugar 1	-0,74*	0,60	0,11	0,34
Entradas Lugar 5	0,72*	0,38	-0,17	0,40
Tiempo Lugar 1	-0,66*	-0,68*	-0,28	-0,27
Tiempo Lugar 5	0,77*	0,50	-0,15	0,46

M3-PRE-ADR: medida 3 pre-adrenalina, PROM PRE-ADR: promedio del consumo oxígeno pre-adrenalina, PROM POST-ADR: promedio del consumo de oxígeno post-adrenalina, DELTA (PRE-POST): delta del promedio de consumo de oxígeno pre y post-adrenalina. *p<0,05.

Tabla 6. Coeficientes de correlación entre el consumo de oxígeno (VO₂) y variables comportamentales de la sesión dos en el LCE

Variables Sesión 2	COEFICIENTE			
	M3- PRE –ADR	PROM PRE-ADR	PROM POST-ADR	DELTA (PRE-POST)
% tiempo brazo cerrado	-0,7576*	-0,6970	0,1394	-0,6242
% tiempo brazo abierto	0,45	0,3752	-0,0438	0,3064
% tiempo en el centro	0,7697*	0,6848*	-0,1879	0,6485*
% Entradas Brazo Abierto	0,6003	0,5002	-0,0938	0,4690
% Entradas Brazo Cerrado	0,7781*	0,6748*	-0,0243	0,5593
Latencia Salida	-0,1429	-0,2571	0,4286	-0,2571
Cruzamientos	0,7416*	0,6626*	0,1033	0,4559
Entradas Lugar 1	0,6545*	0,5016	0,3364	0,2202
Entradas Lugar 5	0,6293	0,5403	-0,0636	0,4640
Tiempo Lugar 1	-0,6848*	-0,5152	-0,1636	-0,2970
Tiempo Lugar 5	0,5503	0,4752	-0,0688	0,3939

M3-PRE-ADR: medida 3 pre-adrenalina, PROM PRE-ADR: promedio del consumo oxígeno pre-adrenalina, PROM POST-ADR: promedio del consumo de oxígeno post-adrenalina, DELTA (PRE-POST): delta del promedio de consumo de oxígeno pre y post-adrenalina. *p<0,05.

5.2 FASE 3: EVALUACION DE EFECTOS DE TIPO ANSIOLITICO DE 1,4-EPOXI-2-ARIL(2-ESTIRIL) Y *cis*-2-(1'-NAFTIL)-4-HIDROXITETRAHIDRO-1-BENZOAZEPINAS EN RATAS EXPUESTAS AL LCE

5.2.1 Molécula CAR24R

Sesión 1

El análisis de varianza de una vía reveló mayores %TBA ($H=14,540$, $GL=4$, $p=0,006$), %EBA ($F(4,61)=3,146$, $p=0,02$) y número de cruzamientos ($F(4,61)=10,015$, $p<0,001$) en el grupo de animales tratado con DZP, en comparación con aquellos que recibieron PTZ (Figuras 28-30).

En el grupo de ratas tratadas con **CAR24R** 10 mg/Kg se observó un %TBA significativamente mayor que aquellas tratadas con PTZ y SSN ($F(4,61)=6,015$, $p<0.001$); no se encontraron diferencias significativas en esta variable entre las dosis de **CAR24R** evaluadas (10 y 5 mg/Kg) y el grupo tratado con DZP (Figura 28). Adicionalmente, se observó un mayor %EBA en aquellos animales expuestos a la molécula **CAR24R** a la dosis de 10 mg/Kg, respecto al grupo tratado con PTZ ($F(4,61)=6,302$, $p<0,001$) ($F(4,61)=4,302$, $p<0,05$) (Figura 29). Por último, al evaluar la actividad locomotora, se encontró que la administración de **CAR24R** a las dos dosis evaluadas derivó en un mayor número de cruzamientos en el grupo de ratas expuestas, en comparación con aquellas que recibieron PTZ ($F(4,61)=9,125$, $p=0,005$ y $p=0,027$) (Figura 30).

Sesión 2

En el análisis de la sesión 2, mediante la prueba de Kruskal Wallis se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la variable %TBA ($H=11,017$, $G.L=4$, $p=0,026$), mostrando que los animales que recibieron en la primera sesión DZP presentaron un %TBA significativamente menor en la segunda exposición, que los tratados con PTZ. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en

las variables %TBA, %EBA o cruzamientos entre la molécula **CAR24R** a las dosis evaluadas y los grupos controles (Figuras 28-30).

El análisis de t-test pareado, con los datos de la sesión 2 comparados con la sesión 1, permitió identificar una disminución significativa en las variables %TBA, %EBA y cruzamientos en los grupos que recibieron SSN o DZP, mientras que los tratados con PTZ presentaron un aumento significativo de la variable cruzamientos durante la segunda sesión (Figuras 28-30). Se observó también una disminución significativa durante la segunda sesión de las variables %TBA ($p=0,023$) ($p=0,006$), y %EBA ($p=0,023$) ($p=0,002$) para la dosis de 5 y 10 mg/Kg de la molécula **CAR24R** (Figuras 28 y 29). Así mismo, se observó una disminución significativa de cruzamientos ($p=0,031$) en las ratas expuestas a la dosis de 10 mg/Kg de **CAR24R** (Figura 30).

5.2.2 Molécula **LIA3M12**

Sesión 1

La molécula **LIA3M12** a las dosis evaluadas no afectó de manera estadísticamente significativa las variables comportamentales evaluadas.

Sesión 2

En el análisis llevado a cabo en la sesión 2, se encontró que el %TBA fue significativamente menor en el grupo de animales que recibieron **LIA3M12** a la dosis de 5 mg/Kg, en comparación con aquellos tratados con PTZ ($H=14,258$, $GL=4$, $p=0,007$) (Figura 28). No se encontraron diferencias entre los grupos en las variables %EBA o número de cruzamientos.

En el análisis de t-test pareado, con los datos de la sesión 2 comparados con los obtenidos en la sesión 1, se encontró una disminución estadísticamente

significativa ($p < 0,05$) en el %TBA, y %EBA en los grupos tratados con **LIA3M12** a dosis de 5 mg/Kg o 10 mg/Kg (Figuras 28 y 29).

5.2.3 Molécula **SAM159C2**

Sesión 1

Los animales tratados con **SAM159C2** a la dosis de 10 mg/Kg presentaron mayor número de cruzamientos que los tratados con PTZ ($F(4,64)=8,609$, $p=0,001$) (Figura 30). No se observaron diferencias significativas en las demás variables evaluadas en los animales tratados con la nueva molécula.

Sesión 2

Para la variable %EBA se encontraron mayores valores en los animales que recibieron **SAM159C2** a la dosis de 10 mg/Kg, en comparación con aquellos tratados con DZP ($H=12,487$, $GL=4$, $p=0,014$) (Figura 29). Por último, la variable cruzamientos se disminuyó en los tratados con **SAM159C2** (25 mg/Kg), al ser comparados con los tratados con PTZ ($F(4,64)=3,977$, $p=0,006$) (Figura 30).

El análisis de t-test pareado, con los datos de la sesión 2 comparados con los obtenidos en la sesión 1, mostró una disminución estadísticamente significativa en el grupo tratado con la molécula **SAM159C2** a la dosis de 25 mg/Kg en las variables %TBA ($p=0,041$), %EBA ($p=0,014$) (Figuras 28 y 29); por otra parte, en los animales que recibieron la molécula **SAM159C2** a una dosis de 10 mg/Kg, sólo se presentó una disminución significativa de la variable cruzamientos ($p=0,012$), entre las dos sesiones (Figura 30).

Figura 28. Porcentaje de tiempo en brazo abierto observado durante la primera y segunda sesión de ratas expuestas a las diferentes moléculas evaluadas. SSN, solución salina normal; DZP, Diazepam; PTZ, Pentilentetrazol. * $p < 0,05$ comparado con grupo de ratas que recibieron pentilentetrazol; ** $p < 0,05$ comparado con grupo de ratas que recibieron solución salina normal; ‡ $p < 0,05$ segunda sesión en comparación con primera sesión

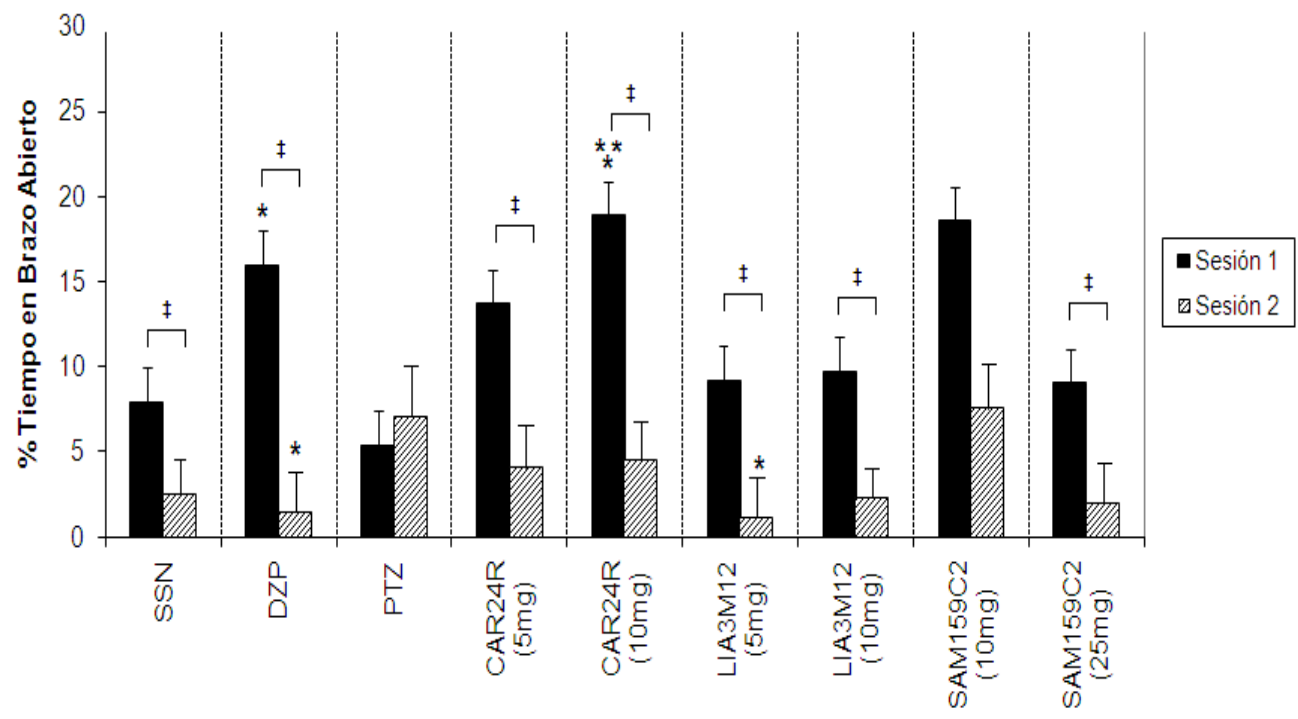


Figura 29. Porcentaje de entradas a brazo abierto observado durante la primera y segunda sesión de ratas expuestas a las diferentes moléculas evaluadas. SSN, solución salina normal; DZP, Diazepam; PTZ, Pentilentetrazol. * $p < 0,05$ comparado con grupo de ratas que recibieron pentilentetrazol; ** $p < 0,05$ comparado con grupo de ratas que recibieron diazepam; ‡ $p < 0,05$ segunda sesión en comparación con primera sesión

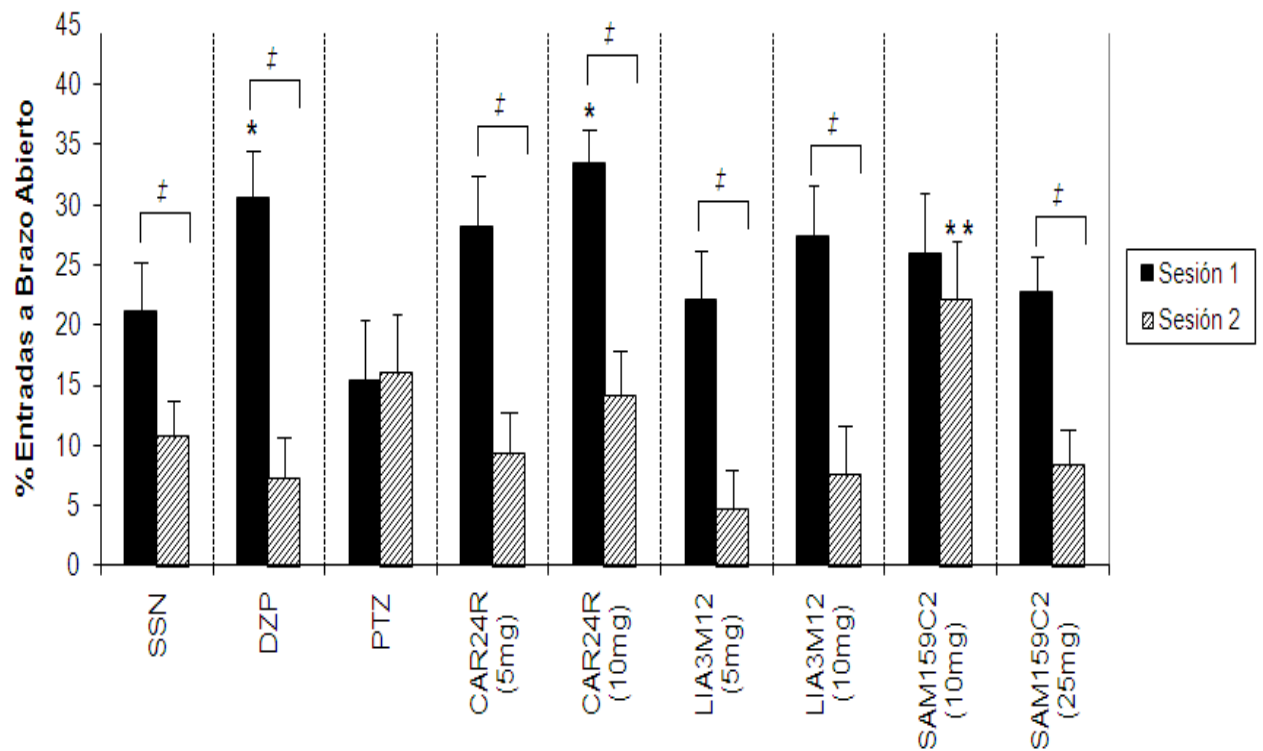
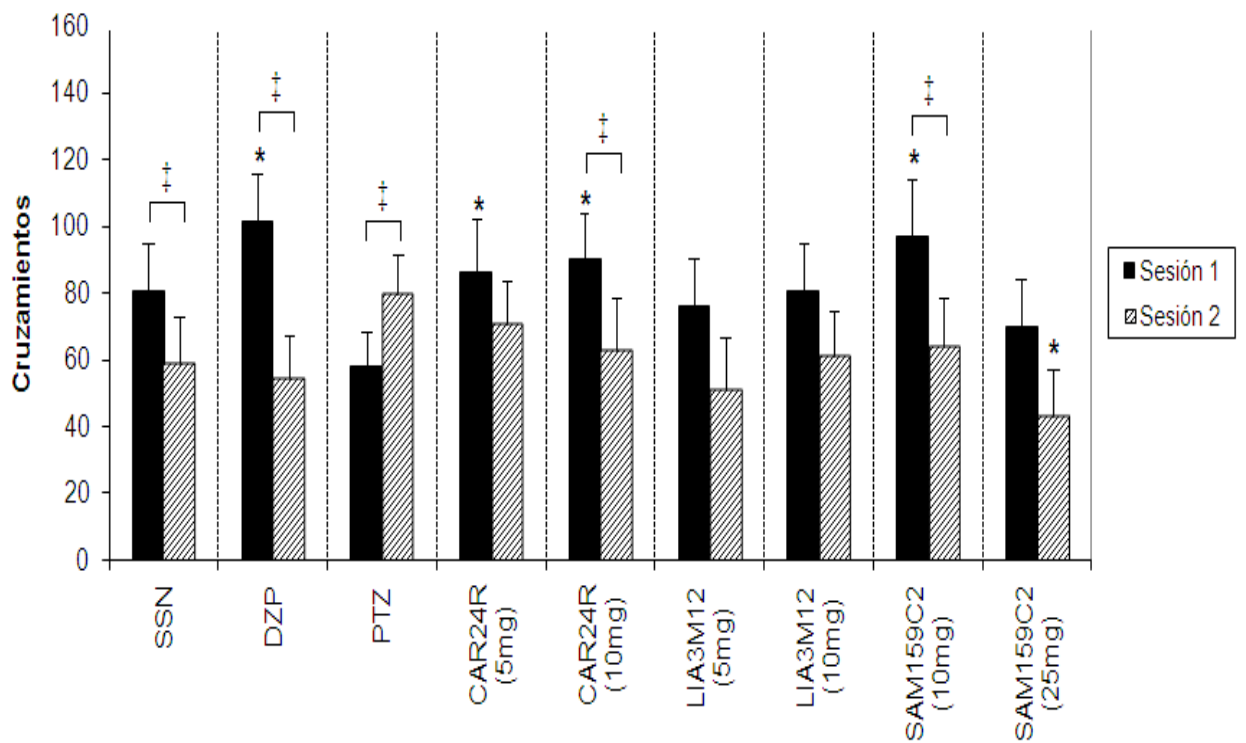


Figura 30. Número de cruzamientos observados durante la primera y segunda sesión de ratas expuestas a las diferentes moléculas evaluadas. SSN, solución salina normal; DZP, Diazepam; PTZ, Pentilentetrazol. * $p < 0,05$ comparado con grupo de ratas que recibieron pentilentetrazol; ‡ $p < 0,05$ segunda sesión en comparación con primera sesión



6. DISCUSION

6.1 FASE 1. IMPACTO DE LOS CRITERIOS DE APRENDIZAJE SOBRE LOS COMPORTAMIENTOS INDICADORES DE ANSIEDAD Y EL DESEMPEÑO MNEMONICO DE RATAS WISTAR-UIS

6.1.1 Impacto sobre Comportamientos Indicadores de Ansiedad y Desempeño MNEMONICO

En la primera fase del presente estudio se observó un efecto significativo del tratamiento utilizado en las variables comportamentales registradas durante la primera exposición de las ratas al LCE. Es así como, aquellas ratas tratadas con DZP en los criterios de 3 y 5 min presentaron un mayor tiempo relativo de permanencia y frecuencia de entradas a brazos abiertos y un mayor número de cruzamientos en comparación con los grupos que recibieron SSN.

Cuando a una rata se le permite explorar el LCE por primera vez, la novedad del ambiente genera un conflicto en el animal, entre la motivación para explorar el laberinto y el temor de entrar a los espacios abiertos (Montgomery 1955). Este temor es en parte, provocado por la conducta marcadamente tigmotáctica de las ratas, lo que hace que eviten los brazos abiertos y prefieran permanecer en los brazos cerrados, los cuales están protegidos por paredes laterales (Treit et al 1993). El tratamiento previo con benzodiazepinas ha mostrado atenuar los niveles de estrés resultantes de este conflicto y aumentar las entradas y tiempo de permanencia de las ratas en los brazos abiertos del LCE (Rosa et al 2000). Los hallazgos en nuestro estudio relacionados con un mayor %EBA y %TBA en la primera exposición al LCE de ratas tratadas con DZP confirma los efectos ansiolíticos de este medicamento.

Aunque la mayoría de estudios describen las variables comportamentales de las ratas expuestas al LCE como promedios en relación con el tiempo total de la sesión, análisis más detallados han sido desarrollados en los últimos años, al dividir el tiempo de la sesión en intervalos de 1 minuto (Rodgers et al 1996, Rosa et al 2000). Este tipo de análisis es una herramienta útil para valorar la distribución temporal de cada variable comportamental a lo largo de cada sesión experimental.

En nuestro estudio, al analizar la evolución temporal de las diferentes variables comportamentales de acuerdo al criterio y tratamiento recibido, no se encontraron diferencias significativas en los valores minuto a minuto de porcentaje de entradas y porcentaje de tiempo en los lugares 1, 4 ó 7 de ratas con criterio de 1min que hubiesen recibido SSN o DZP. Estudios previos han mostrado que el comportamiento de las ratas durante el primer minuto de exploración del LCE está caracterizado por la valoración del riesgo desde el centro de la plataforma, con poca discriminación de los brazos abiertos y cerrados (Rodgers 1996), por lo que es posible que en este periodo no sea posible caracterizar las respuestas comportamentales en respuesta al efecto ansiolítico del DZP. Sin embargo, del segundo minuto en adelante, las ratas incrementan su conducta evitativa de los brazos abiertos y del centro del LCE, disminuyendo su actividad exploratoria y prefiriendo permanecer por mayores periodos de tiempo en los brazos cerrados (Rosa 2000). Esto está en concordancia con lo encontrado en nuestro estudio donde se observaron menores valores de %EBA y %TBA en los lugares 4 y 7 del LCE en el grupo de ratas con criterio de 3 y 5 min que recibieron SSN en comparación con las tratadas con DZP a partir del tercer minuto de iniciada la sesión.

Complementariamente, al evaluar los resultados obtenidos de acuerdo a lugares específicos del laberinto, fue observado un mayor porcentaje de entradas y porcentaje de tiempo en los lugares 1 y 3 del LCE durante la primera sesión en aquellas ratas con criterio de 3 y 5 min respectivamente que recibieron SSN en

comparación con las tratadas con DZP. Tradicionalmente, parámetros como el número de entradas a brazos cerrados o el número total de entradas a los diferentes brazos del LCE han sido relacionadas con la actividad locomotora de los animales evaluados (Espejo 1997, Rodgers & Dalvi 1997). Sin embargo, se ha visto que la disociación entre locomoción y ansiedad no es tan clara como se pensaba previamente, y de hecho este tipo de actividad motora podría estar motivada más por miedo que por el deseo exploratorio de los animales expuestos al LCE (Weiss et al 1998). Por lo tanto, el % de entradas y de tiempo en brazos cerrados podría ser también una medida de ansiedad en los animales evaluados en el LCE que recibieron SSN.

Durante la exposición al LCE y en respuesta a la ansiedad experimentada, las ratas adquieren y codifican información acerca de la distribución espacial del laberinto, como por ejemplo su posición dentro del laberinto, la disposición de los brazos previamente visitados, la localización de áreas con mayores o menores propiedades aversivas etc. Al ser nuevamente expuestas al LCE, las ratas experimentan cambios comportamentales significativos en relación con la primera exposición. Típicamente, las ratas presentan un incremento en la evitación de los brazos abiertos y una preferencia mayor por las secciones cerradas del laberinto (Rodgers 1996). En el presente estudio no fueron observados reducciones significativas de las variables de %EBA o %TBA durante la segunda sesión en el grupo de ratas que recibió SSN, sin embargo, sí fue observado un aumento de la latencia de salida a brazos abiertos durante la segunda sesión en las ratas de los tres criterios evaluados (1, 3, 5 min) en comparación con las ratas tratadas con DZP, lo que indica la presencia de aprendizaje emocional como consecuencia del estrés experimentado durante la primera sesión.

Durante la segunda sesión, fue observado también un menor valor de porcentaje de entradas al lugar 7 de las ratas de criterios de 5min que recibieron SSN, mientras que en los otros grupos no fueron encontradas diferencias significativas

asociadas a lugares específicos del LCE. Este aprendizaje emocional diferencial puede ser consecuencia del mayor tiempo de exploración del LCE que tuvo el grupo de 5min, en comparación con las ratas de otros criterios de tiempo, lo cual les habría permitido la obtención de un mayor número de pistas sobre la disposición espacial del LCE y consecuentemente la adquisición de una mayor habilidad para evitar los brazos abiertos durante la segunda exposición al LCE.

6.1.2 Impacto sobre los Niveles de Glicemia

En el presente estudio no fue observado un efecto significativo de los criterios de aprendizaje en los valores de glicemia, sin embargo, sí fueron encontrados mayores valores de glicemia post-sesión 1 y 2 en relación con el valor basal dentro del grupo de ratas tratadas con SSN. La elevación de este marcador fisiológico puede ser interpretada como producto de los niveles de estrés experimentados por los animales durante su exposición al LCE. Estos resultados están en concordancia con lo hallado previamente por Mello y colaboradores (2007), quienes reportaron un incremento similar en los niveles de glicemia después de exponer ratas machos Wistar al LCE y a la aplicación intracerebral de sustancia P, un decapeptido con efectos ansiogénicos. Se han reportado también, elevados niveles de glicemia en animales sometidos a otros tipos de estresores como lo son la aplicación de estímulos eléctricos plantares (footshock-stress) (Verago et al 2001) o de estrés por inmovilización (Márquez et al 2004).

Los mecanismos a través de los cuales el estrés afecta el metabolismo de la glucosa son bien conocidos. Es aceptado que el sistema nervioso central juega un papel importante en la regulación del metabolismo hepático de la glucosa, mediante la activación del sistema nervioso simpático y la liberación de sustancias como la corticosterona, glucagón y epinefrina (Nonogaki 2000).

Al realizar un análisis de correlación entre los valores de glicemia y las variables comportamentales de las ratas evaluadas, se encontró una asociación diferencial de acuerdo al criterio de aprendizaje utilizado. En el grupo de ratas de 5 min que recibieron SSN, se evidenció una correlación inversa entre los niveles de glicemia posteriores a la sesión 1 y el porcentaje de tiempo de permanencia y de número de entradas a los lugares 6 y 7 del laberinto, los cuales representan los extremos distales de los brazos abiertos. Es decir, que aquellas ratas que presentaron un menor número de ingresos a estas secciones de los brazos abiertos presentaron los niveles más altos de glicemia. Como es bien sabido, en el LCE, el porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en brazos abiertos se consideran variables comportamentales negativamente relacionadas con los niveles de ansiedad de los animales (File 1993), lo que indica que aquellas ratas con mayores niveles de estrés, fueron las que presentaron mayores niveles de glicemia.

De manera inversa a lo observado en las ratas con criterio de 5 min, las ratas del grupo de 3 min presentaron una asociación positiva entre los valores de glicemia y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos. Análisis minuto a minuto del comportamiento exploratorio de las ratas durante una exposición de 5 min al LCE, ha demostrado que a medida que el tiempo pasa se incrementa la evitación de los brazos abiertos, llegando a tener una diferencia significativa en esta variable comportamental al final de la prueba, en comparación con el primer minuto (Rosa et al 2000). Es probable que los animales del grupo de 3 min hayan iniciado el establecimiento del peso emocional de las secciones del laberinto sin alcanzar aún los niveles de evitación de los brazos abiertos observados en el grupo de 5 min, lo que podría explicar la elevación de los niveles de glicemia en relación con una mayor exposición a los brazos abiertos del laberinto. Esto está soportado por nuestros resultados, en el sentido que al realizar análisis minuto a minuto del comportamiento de las ratas en el LCE, se observó una diferencia significativa en el tiempo y número de entradas al lugar 7 en el grupo de 5 min que recibieron SSN en comparación con el de DZP, mientras que en el grupo de 3 min la diferencia fue

observada en el número de entradas mas no en el tiempo de permanencia en este lugar. Por último, en el grupo de ratas con criterio de 1 min no se observaron asociaciones significativas entre la glicemia y el número de entradas o tiempo de exposición a los brazos abiertos del LCE, lo que puede ser explicado por que este grupo aún se encontraba en una fase de actividad exploratoria para valoración del riesgo y la muestra de glicemia posiblemente fue tomada antes del establecimiento del peso emocional de las secciones del LCE por parte del animal (Rodgers et al 1996).

La elevación de los niveles de glicemia durante la exposición de ratas a una situación de estrés ayuda no solo a suplir la demanda de energía requerida para una eventual reacción de huida o un ataque por parte del animal, sino que también participa como sustrato metabólico necesario para los cambios neuronales facilitadores del proceso de aprendizaje emocional (Messier 2004). La glucosa puede modular este aprendizaje al cruzar la barrera hematoencefálica y suplir la demanda metabólica de áreas cerebrales específicas (Messier 2004). De hecho, estudios previos han mostrado una disminución de los niveles de glucosa en el hipocampo de ratas expuestas al LCE (Rex et al 2009), sugiriendo una mayor actividad metabólica de esta área y consecuentemente una mayor actividad neuronal, posiblemente relacionada con procesos de aprendizaje. Aunque en este estudio no se evaluaron los niveles de glucosa extracelular en el sistema nervioso central, es posible que ciertas áreas relacionadas con el aprendizaje y la memoria emocional se hayan visto favorecidas por el aumento en los niveles de glicemia durante la exposición al LCE (McNay et al 2001).

Como soporte a lo mencionado anteriormente, en el presente estudio se encontró una correlación negativa entre los niveles de glicemia posteriores a la primera exposición al LCE y el porcentaje de tiempo y entradas a los lugares 6 y 7 de los brazos abiertos, durante la segunda sesión en las ratas con criterio de 5 min que recibieron SSN. Estos resultados sugieren que la glucosa puede tener un efecto

facilitador en los procesos de memoria emocional en estos animales. Estudios previos soportan el papel fundamental de la glicemia en los procesos de aprendizaje emocional en ratas. Ghizoni y colaboradores (2006) realizaron un experimento en el cual administraron a ratas expuestas al LCE el compuesto 2-deoxi-D-glucosa, un competidor de la glucosa por la hexoquinasa que inhibe su utilización intracelular. En este estudio, encontraron que este análogo competitivo de la glucosa alteró los procesos de aprendizaje emocional en los animales expuestos, ya que no se observó una disminución del tiempo o entradas a los brazos abiertos durante una segunda sesión del LCE en las ratas que recibieron el compuesto.

A diferencia de los grupos que recibieron SSN, en los grupos de ratas tratados con DZP no fueron observadas correlaciones entre los niveles de glicemia y el número de entradas o tiempo de permanencia en brazos abiertos, en primera o segunda sesión del LCE. Previamente, Ramanathan y colaboradores (1998) reportaron que el DZP reducía los comportamientos indicadores de ansiedad en ratas con diabetes experimental inducida por estreptozotocina, con lo cual establecieron que el DZP es efectivo en eliminar el efecto ansiogénico asociado a hiperglicemia. Ya que el efecto sobre el aprendizaje emocional asociado a la glicemia está relacionado con la activación del sistema nervioso simpático, es probable que la administración de DZP haya afectado este proceso, al disminuir el grado de activación noradrenérgico mediante sus propiedades ansiolíticas. Adicionalmente, la administración de DZP ha demostrado disminuir el uso de glucosa en diferentes áreas cerebrales (Kelly et al 1986, Eintrei et al 1999), por lo que su acción inhibitoria del efecto potenciador de la glucosa en la memoria, puede no estar relacionada únicamente con sus efectos ansiolíticos.

Los resultados de esta fase del estudio sugieren que la exposición de ratas a las condiciones estresantes propias del LCE, desencadena una serie de eventos fisiológicos que llevan a un incremento de los niveles de glicemia, posiblemente

relacionado con el soporte metabólico necesario para los procesos relacionados con el aprendizaje emocional.

6.2.1 Fase 2.1 Consumo de Oxígeno Por Horario y Sexo en Ratas WISTAR-UIS

En la segunda fase del presente estudio fueron observadas diferencias en el consumo de oxígeno de ratas hembras de acuerdo al momento del día en que fue realizada la medición, encontrándose un menor valor durante la mañana, en comparación con los resultados obtenidos en la tarde.

Estudios previos han evidenciado que el consumo de oxígeno es una variable fisiológica que presenta una modulación circadiana (Cohen & Albers 1991). Se ha demostrado, en el caso de las ratas, animales nocturnos, que el consumo de oxígeno es mayor en la noche que durante el día, lo que está relacionado con mayores requerimientos energéticos y de ventilación debidos a un mayor nivel de actividad física y de excitación durante este periodo, mientras que durante el día, que corresponde a la fase de sueño en el caso de las ratas, se presenta una disminución en la tasa metabólica y en la ventilación (Stephenson et al 2001). A pesar de que la variación de este parámetro fisiológico con el ciclo claro-oscuro es bien conocida, pocos estudios se han realizado para determinar si existen diferencias de esta variable a lo largo del ciclo claro. Esto es de gran relevancia, debido a que la mayoría de experimentos con ratas son realizados durante el día, por lo que este tópico debe ser explorado para garantizar una correcta utilización del consumo de oxígeno como marcador fisiológico en estos animales.

Un estudio realizado por Nagai y colaboradores (1985), utilizando como animales de experimentación ratas macho Wistar y una cámara respiratoria abierta con un analizador magnético de oxígeno, para la medición del VO_2 , con intervalos de 30 minutos entre mediciones, durante todo el día (incluyendo ciclo claro y oscuro),

mostró que el VO_2 era mayor durante las 12 horas del ciclo oscuro ($5,47 \pm 0,28$ mL/min STPD) que durante las 12 horas del ciclo claro ($4,30 \pm 0,19$ mL/min STPD), también se observó un menor valor de consumo de oxígeno al inicio del ciclo claro en comparación con el final de este periodo. Este estudio está en contradicción con el estudio realizado por Maxwell y colaboradores (1985), en el cual, con la utilización de hembras Wistar de 21 días de edad y medición del consumo de oxígeno mediante un respirómetro, cada 45-50min, se evidenció un mayor consumo de oxígeno durante la mañana ($40,8 \pm 2,5$ mL/min/Kg en STPD), en comparación con las mediciones realizadas a mediodía ($26,9 \pm 4$ mL/min/Kg en STPD) y en la tarde ($25,4 \pm 4,2$ mL/min/Kg en STPD).

Una posible explicación para estas diferencias, podrían ser las diferentes metodologías usadas para la evaluación del consumo de oxígeno. En el estudio realizado por Maxwell y colaboradores (1985) se utilizó una cámara de respirómetro convencional, con mediciones realizadas de manera manual por el experimentador, y en tiempos específicos del día, mientras que en el estudio de Nagai y colaboradores (1985) se utilizó una cámara de respirómetro abierto, con un analizador de oxígeno magnético, con rangos de medición más cortos, de manera automática y a lo largo de todo el día (Nagai et al 1985). A este respecto, es posible que la utilización de métodos que sean menos dependientes del evaluador, garantice resultados más confiables y reproducibles.

Independientemente de las diferencias encontradas entre mañana y tarde, los estudios realizados hasta el momento apuntan a que el consumo de oxígeno presenta oscilaciones a lo largo del día en las ratas evaluadas. Estas variaciones pueden ser debidas a que las ratas presentan un ciclo de sueño fragmentado, lo que lleva a que se presenten oscilaciones de diferentes variables fisiológicas, como la temperatura corporal, el metabolismo gaseoso y la ventilación pulmonar entre otras, con la presentación de picos de aumentos y disminuciones a lo largo de este ciclo (Mortola 2004, Mortola 2007). En el caso de los humanos, no se

presenta esta variación, debido a que su sueño es más organizado y continuo, en un solo bloque de varias horas (Mortola 2004).

Otras variables como la raza, edad y sexo de las ratas utilizadas pueden tener influencia sobre el consumo de oxígeno y ser responsable por las diferencias reportadas por estudios previos. En el presente estudio fueron observadas diferencias en el consumo de oxígeno relacionadas con el sexo, encontrándose un mayor valor de VO_2 en las ratas macho en comparación con las hembras durante la mañana. Estudios previos han mostrado diferencias en esta variable dependientes del sexo, posiblemente relacionadas con la fase del desarrollo sexual en los animales evaluados. En ratas Long Evans se encuentran valores similares de consumo de oxígeno antes de la pubertad, sin embargo al alcanzar el desarrollo sexual se observa un menor valor de VO_2 en ratas hembras (Rich et al 2007). Estas diferencias pueden ser debidas a influencias hormonales durante las diferentes fases del ciclo estral. Es así como se ha encontrado que durante la fase diestro se observan menores valores de consumo de oxígeno en hembras en comparación con la fase proestro (Lebrun et al 1995, Luz & Griggio 1998).

Otros estudios en humanos han mostrado que los hombres presentan mayor consumo de oxígeno que las mujeres, debido a que el VO_2 depende en gran medida del peso corporal y de la masa muscular activa, y en el caso de las mujeres, estas presentan en su composición corporal menor desarrollo de masa corporal magra y un 10% más de grasa corporal que el hombre; por tanto, es probable que las diferencias por género, sean debidas también a diferencias en la composición de tejido adiposo (Pate et al 1987, Zurita 2009).

En la interpretación de los resultados del presente estudio, deben ser tomadas en cuenta algunas limitaciones. Por un lado, solo fueron realizadas 3 mediciones de VO_2 durante la mañana y la tarde en las ratas evaluadas. Es posible que la realización de un mayor número de mediciones a lo largo del día, permita

establecer con mayor precisión las oscilaciones presentes en este parámetro. Adicionalmente, aunque fue utilizado un mismo grupo de animales para la evaluación del consumo de oxígeno durante la mañana y la tarde, estas mediciones fueron realizadas con una semana de diferencia, por lo que es probable que variaciones en la fase del ciclo estral de las hembras evaluadas hayan influenciado los resultados obtenidos. A pesar de estas limitaciones, los resultados de esta fase resaltan la importancia de estandarizar las condiciones ambientales, de horario y de los animales evaluados, para una adecuada utilización del consumo de oxígeno, en estudios de investigación de procesos funcionales y de correlación de esta medida con otros procesos biológicos.

6.2.2 Fase 2.2 Correlación entre Consumo de Oxígeno Basal y Post-Aplicación de Adrenalina y Manifestaciones Comportamentales de Ansiedad

Este experimento se basó en el concepto que frente a situaciones de amenaza real o potencial, se espera que un organismo presente respuestas simpáticas adrenérgicas y con ello, las manifestaciones propias de tal activación (Korol & Gold 1998). Dentro de las respuestas esperadas, se encuentran cambios en la tasa metabólica, lo cual puede ser evidenciado por cambios en el consumo de oxígeno de los animales expuestos a tales situaciones (Alexander et al 1972, Hulks et al 1991, West et al 2006). En este sentido, los cambios en el consumo de oxígeno frente a la inyección de adrenalina, debería dar una idea razonable acerca de la reactividad emocional y metabólica que un individuo tiene frente a una situación percibida como estresante, como lo es la exposición al LCE.

Con base en esto, en esta fase se evaluó el consumo de oxígeno basal de ratas Wistar-UIS, así como su cambio al someterlas a estrés farmacológicamente inducido, mediante la aplicación de una dosis de adrenalina (0,05 mg/Kg).

Posteriormente se determinó la existencia de correlación entre estos niveles de VO_2 , con el comportamiento presentado durante la exposición al LCE.

En el experimento no fueron observados cambios significativos en el consumo de oxígeno atribuibles a la aplicación de adrenalina. Estudios previos han sugerido que los efectos de la adrenalina sobre el consumo de oxígeno son dependientes de la dosis. Es así como, en un estudio realizado por Alexander y colaboradores (1972) en corderos recién nacidos, se observó que la aplicación de adrenalina a una dosis de $1 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$, produjo un incremento en el consumo de oxígeno de $0,49 \text{ L.O}_2/\text{Kg}.\text{hr}$, mientras que la aplicación de dosis mayores ($10 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$) resultó en una disminución de $0,43 \text{ L.O}_2/\text{Kg}.\text{hr}$. Este comportamiento sugirió un efecto de la adrenalina sobre el consumo de oxígeno en forma de U invertida, similar al efecto que ejerce sobre la memoria (Baldi & Bucherelli 2005). Previamente, Benthem y colaboradores (1990) encontraron que la infusión de adrenalina a dosis de 35 y 50 ng/min en ratas durante 40 minutos, incrementó los valores de consumo de oxígeno y glicemia. En este estudio se utilizaron dosis significativamente menores que las utilizadas en nuestro experimento, lo que sugeriría la presencia del efecto en U invertida, sin embargo, para comprobar esta hipótesis, es necesario realizar un nuevo estudio en el que se evalúe el efecto de un amplio rango de dosis de adrenalina, sobre el consumo de oxígeno de estos animales (Curva Dosis-Respuesta).

La adrenalina produce incrementos en la respiración y ventilación, mediante estimulación beta adrenérgica que lleva a dilatación bronquial (Lundholm & Svedmyr 1966). Sin embargo, a altas dosis la adrenalina puede producir supresión de la actividad muscular voluntaria, teniendo como consecuencia la presentación de irregularidades respiratorias y apneas (Heim & Hull 1966, Alexander et al 1972). Una limitación del estudio es que la técnica utilizada para la evaluación del consumo de oxígeno, es dependiente de los movimientos del aparato respiratorio y de la regularidad de la frecuencia respiratoria, por lo que es posible que la

presencia de alteraciones en esta variable por la aplicación de una alta dosis de adrenalina hayan influenciado los resultados obtenidos.

A pesar de que no fue observado un efecto de la aplicación de adrenalina sobre el consumo de oxígeno en los animales evaluados, sí fueron encontradas correlaciones significativas de los valores basales de consumo de oxígeno con las variables comportamentales de las ratas expuestas al LCE. Específicamente se observó una correlación negativa de la medición 3 de consumo de oxígeno basal con variables relacionadas con características ansiogénicas, como el tiempo de permanencia y el valor relativo de las entradas a brazo cerrado, mientras que fue evidente una correlación positiva con variables indicadoras de un componente ansiolítico, como el tiempo y número de entradas en brazo abierto. Esto mostrando que, las ratas con un mayor consumo de oxígeno a nivel basal, presentaron menor reactividad emocional a la exposición al LCE. En la segunda exposición al LCE, se mantuvieron las correlaciones ya descritas, con aquellas ratas con un mayor consumo de oxígeno basal presentando un menor número de entradas a brazos cerrados. Este resultado es concordante con lo observado en la primera sesión, ya que al presentar las ratas con un mayor consumo de oxígeno, una menor reactividad emocional, era de esperarse que tuvieran un menor aprendizaje de los estímulos aversivos del LCE y una menor evitación de los mismos en una segunda sesión.

Los resultados descritos en nuestro experimento están en armonía con estudios realizados en humanos, como el llevado a cabo por Karapolat y colaboradores (2007), en el cual se incluyeron pacientes con trasplante de corazón, a los cuales se les evaluó el estado emocional mediante el cuestionario STAI (inventario de ansiedad estado y rasgo), y se evaluaron parámetros fisiológicos como el consumo de oxígeno, encontrando un mayor valor de esta variable en los individuos con bajo estado de ansiedad. De igual manera, Masaoka & Homma (1999) encontraron en un grupo de estudiantes universitarios, a los cuales se les

evaluó el estado de ansiedad mediante el cuestionario STAI y variables fisiológicas como el consumo de oxígeno en respuesta a una serie de pruebas mentales, que aquellos con menores niveles de ansiedad presentaban mayores valores de consumo de oxígeno en condiciones basales y en respuesta a estresores.

Tradicionalmente el consumo de oxígeno ha sido utilizado como un marcador del estado metabólico de un individuo en respuesta a la realización de actividad física, sin embargo, existen pocos estudios que hayan evaluado la presencia de alteraciones en este parámetro relacionadas con factores psicológicos. Previamente se ha establecido que sujetos con ansiedad crónica presentan irregularidades en sus patrones respiratorios (Tobin et al 1983), lo cual puede llevar a menores valores de consumo de oxígeno en respuesta a estresores psicológicos. En el presente estudio fue observada una correlación negativa del consumo de oxígeno basal con la reactividad emocional de las ratas expuestas al LCE, indicando un menor VO_2 en aquellas ratas con mayor reactividad. Es necesario aclarar que es posible que la tercera medición de consumo de oxígeno basal con la cual fueron encontradas las correlaciones, haya correspondido no al estado basal propiamente dicho, sino a la respuesta de los animales a un grado considerable de estrés, debido a la manipulación y tiempo de confinamiento en el dispositivo de medición del VO_2 . De este modo, es interesante suponer que aquellas ratas con un mayor grado de reactividad emocional, hayan presentado alteraciones en su patrón respiratorio, en respuesta a la manipulación y tuvieran como consecuencia menores niveles de VO_2 .

Independientemente de los mecanismos involucrados, los resultados obtenidos en esta fase del estudio sugieren que el consumo de oxígeno puede actuar como indicador de estados fisiológicos y emocionales y posiblemente tener utilidad como predictor de la reactividad y aprendizaje emocional de ratas expuestas al LCE.

6.3 FASE 3: EVALUACION DE EFECTOS DE TIPO ANSIOLITICO DE 1,4-EPOXI-2-ARIL(2-ESTIRIL) Y cis-2-(1'-NAFTIL)-4-HIDROXITETRAHIDRO-1-BENZOAZEPINAS EN RATAS EXPUESTAS AL LCE

El uso del LCE como modelo experimental de ansiedad se basa en la aversión natural de algunos roedores a los espacios abiertos y a la altura (Pellow et al 1985). Este modelo ha sido ampliamente validado y se ha podido documentar que el confinamiento de ratas a los brazos abiertos del laberinto, se correlaciona fuertemente con comportamientos indicadores de ansiedad como congelamiento (freezing) y una mayor presencia de bolos fecales, en comparación con animales confinados a los brazos cerrados (Pellow et al 1985, Carobrez & Bertoglio 2005). Así mismo, las ratas expuestas a los brazos abiertos presentan incrementos en las concentraciones plasmáticas de hormonas de estrés, con respecto a animales que permanecen en sus jaulas o confinados a los brazos cerrados (Pellow et al 1985). Estudios previos han podido determinar que el aumento de entradas y tiempo de permanencia en brazos abiertos son indicativos de los efectos ansiolíticos de diferentes fármacos usados en humanos, como el clordiazepóxido y el diazepam (Pellow et al 1985, File et al 1994, Griebel et al 1999), mientras que el PTZ que actúa como ansiogénico, disminuye estos comportamientos (Pellow et al 1985).

En esta fase se buscó determinar, mediante la evaluación del comportamiento de ratas expuestas al LCE, si un nuevo grupo de moléculas derivadas de la tetrahydro-1-benzoazepina exhibían una respuesta de tipo ansiolítica. El principal resultado obtenido fue que el tratamiento con la molécula **CAR24R**, a dosis de 10 mg/Kg, produjo en las ratas expuestas una mayor exploración de los brazos abiertos, tanto en entradas como en tiempo de permanencia, en comparación con los animales tratados con PTZ. En el caso de la variable tiempo en brazo abierto, la diferencia se encontró al comparar no solo con aquellos animales tratados con el medicamento ansiogénico, sino también con aquellas ratas que recibieron solución salina. Adicionalmente, se observó una mayor actividad locomotora en

estos animales y su comportamiento en el laberinto fue similar a aquellos que recibieron DZP. Estos resultados sugieren la existencia de un efecto de tipo ansiolítico producido por esta nueva molécula.

En el caso de las moléculas **SAM159C2** a una dosis de 25 mg/Kg, y **LIA3M12** a una dosis de 5 ó 10 mg/Kg, no se observó un efecto significativo en los animales que las recibieron, en las variables tomadas en cuenta para la evaluación del efecto ansiolítico o de la actividad locomotora. Por otro lado, las ratas que recibieron las moléculas **CAR24R** a una dosis de 5 mg/Kg y **SAM159C2** a una dosis de 10 mg/Kg, no presentaron diferencias significativas en el tiempo o porcentaje de entradas a brazos abiertos, en comparación con los grupos controles; sin embargo, se observó un mayor número de cruzamientos en estos animales. Previamente, Dawson y Cols (1995) encontraron en ratas expuestas al LCE, que el uso de clordiazepóxido, así como de anfetamina incrementan las entradas a los brazos abiertos, sin embargo, en el caso de la anfetamina, medicamento no ansiolítico, este aumento fue debido al incremento en la actividad locomotora (Dawson et al 1995a). Es por esto que el incremento en la actividad locomotora, medida por el número de cruzamientos, no es en sí misma una medida sensible de actividad ansiolítica, si no está acompañada de un incremento en los porcentajes de tiempo en los brazos abiertos (Dawson et al 1995a, Dawson et al 1995b, Báez et al 2001).

Para evaluar posibles efectos de las nuevas moléculas sobre el desempeño mnemónico de los animales evaluados, fue realizada una segunda sesión de exposición de las ratas al LCE, 72 horas después de la primera sesión. En esta segunda sesión, se observó una reducción del tiempo y porcentaje de entradas a brazo abierto en la mayoría de moléculas evaluadas. Este cambio en el comportamiento indica evitación hacia los brazos abiertos cuando el animal es expuesto nuevamente al laberinto, sugiriendo que el proceso de consolidación de la información aversiva generada por la exposición al laberinto, se dio de una

manera adecuada (File et al 1990a, File 1990b, Bertoglio & Carobrez 2000, Lamprea et al 2010). Sólo en aquellas ratas expuestas a PTZ o a la molécula **SAM159C2** a una dosis de 10 mg/Kg no se observaron reducciones significativas en el tiempo o porcentaje de entradas a brazo abierto durante la segunda sesión del LCE. En el caso del PTZ, es probable que la exposición de las ratas a este compuesto ansiogénico durante la primera sesión, haya producido una cantidad de estrés emocional excesivo que llevara a la supresión de comportamientos exploratorios e impidiera un adecuado aprendizaje de las diferentes secciones del laberinto. Esta observación está soportada por el hecho que las ratas que recibieron PTZ presentaron una menor motilidad durante la primera sesión, posiblemente relacionada con comportamiento de tipo “freezing” (Blanchard et al 1993, Holmes & Rodgers 2003). Por otro lado, en el caso de la molécula **SAM159C2** (10 mg/Kg), la ausencia de cambios en las variables estudiadas durante la segunda sesión, podría estar relacionada con efectos negativos de ese compuesto sobre el desempeño mnemónico de estos animales, dado que el comportamiento de las ratas durante la primera sesión fue similar al de los otros grupos evaluados.

Los efectos de tipo ansiolíticos encontrados para la molécula **CAR24R** a dosis de 10 mg/Kg, pueden ser debidos a similitudes con los mecanismos de acción de las benzodiazepinas. Los ansiolíticos benzodiazepínicos actúan como moduladores alostéricos positivos de la neurotransmisión inhibitora rápida del ácido gamma aminobutírico (GABA), el cual es el principal neurotransmisor inhibitor en el sistema nervioso central de los mamíferos. Los efectos del GABA son mediados a través de su interacción con los receptores GABA (A y B) (Danneberg & Weber 1983, Stephenson 1988), que se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro, con alta densidad en la corteza frontal, el hipocampo, el cerebelo, el núcleo interpeduncular y el núcleo talámico (Stephenson 1988). Los receptores GABA-A están dispuestos en forma de columnas helicoidales alrededor de un canal de cloro; cuando el GABA se une a su receptor GABA-A, sus columnas

interactúan abriendo el canal de cloro, esto lleva a un aumento en su conductancia, lo que, a su vez, inhibe la descarga de la neurona (inhibición del potencial de acción). Las benzodiazepinas logran su efecto mediante su unión a un dominio extracelular de un subtipo del receptor GABA-A, esta unión potencia la capacidad del GABA de aumentar la conductancia del cloro a través de su canal (Bowery et al 1987, Prichett et al 1989). La unión en simultáneo, del GABA y de la benzodiazepina, a sus respectivos receptores amplía enormemente la capacidad de la neurona para regular la neurotransmisión inhibitoria rápida; y es esto lo que finalmente produce los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas.

Las moléculas desarrolladas y evaluadas en la presente fase son compuestos que presentan cierta semejanza estructural con las benzodiazepinas, de hecho son considerados como mono-aza-análogos de estas últimas (Dannenberg & Weber 1983). Sus rasgos estructurales característicos son un anillo de benceno fusionado a la cara **b** del anillo de la tetrahydroazepina, pero con sustituciones en la posición C-2 del anillo heterocíclico. Así, la molécula **CAR24R** presenta un anillo de naftaleno en esta posición y adicionalmente un grupo hidroxilo en la posición C-4, mientras que la molécula **LIA3M12** presenta un fragmento trans-estirilo y la molécula **SAM159C2** un anillo de benceno. Futuras evaluaciones neuroquímicas serán necesarias para establecer los mecanismos específicos por los cuales la molécula **CAR24R** presentó un efecto de tipo ansiolítico, mientras que las otras dos moléculas no mostraron efectos similares.

En conclusión, los resultados del presente estudio permitieron establecer que la molécula **CAR24R** presenta efectos de tipo ansiolítico en ratas expuestas al LCE, sin la asociación de efectos secundarios propios de las benzodiazepinas, como sedación. Esta molécula debe ser objeto de futuros estudios, enfocados a determinar su potencial terapéutico como medicamento ansiolítico en humanos.

7. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo sugieren que la utilización de criterios de aprendizaje, basados en diferentes tiempos de permanencia en los fuera de los brazos abiertos del LCE, permite la manipulación de la cantidad de información recibida por las ratas y tiene un efecto diferencial sobre las variables comportamentales, el proceso de aprendizaje emocional y los niveles de glicemia observados durante su exposición al LCE. De manera específica, se considera que la permanencia de las ratas por un periodo de 5 minutos en los fuera de los brazos abiertos, tiene un efecto significativo en el desencadenamiento de respuestas comportamentales de ansiedad en las ratas a partir del minuto 3 de la exposición al LCE, suficiente para producir un proceso de aprendizaje emocional que modifique su patrón comportamental durante una segunda sesión del LCE. Adicionalmente, en este grupo de ratas la glicemia tuvo una correlación significativa tanto con las variables comportamentales observadas en la sesión 1, como con su desempeño mnemónico durante una segunda exposición al LCE, constituyéndose en un marcador de reactividad emocional adecuado.

En relación al estudio del consumo de oxígeno como marcador de reactividad emocional en este grupo de animales, se encontró que presenta variaciones dependientes del momento de su medición durante el día y el sexo de los animales evaluados, por lo que se resalta la importancia de estandarizar las condiciones ambientales, de horario y de los animales evaluados, para una adecuada utilización del consumo de oxígeno en estudios de investigación de procesos funcionales y de correlación de esta medida con otros procesos biológicos. Por otro lado, se evidenció que los valores de este parámetro en respuesta a una situación de estrés producida farmacológicamente, mediante la administración de adrenalina, no estuvo correlacionada con el comportamiento de

las ratas evaluadas durante la primera o segunda sesión de exposición al LCE, sin embargo, la utilización de una medida basal de consumo de oxígeno sí puede ser efectiva en la identificación de ratas con una mayor reactividad emocional al LCE. Por último, la realización del presente estudio permitió establecer que la nueva molécula **CAR24R** desarrollada por el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Universidad Industrial de Santander, presenta efectos de tipo ansiolítico en ratas expuestas al LCE, sin la asociación de efectos secundarios propios de las benzodiazepinas, como la sedación, por lo que debe ser objeto de futuros estudios enfocados a determinar su potencial terapéutico como medicamento ansiolítico en humanos.

8. PERSPECTIVAS

A pesar que el presente estudio permitió establecer que la glicemia presenta una buena correlación con el comportamiento de las ratas durante una primera sesión y su desempeño mnemónico durante una segunda exposición al LCE, aún queda por esclarecer cuales serían los mecanismos específicos en el sistema nervioso central de estos animales, que permitiría este efecto facilitador de la glucosa en los procesos de aprendizaje emocional. Una posibilidad para futuros estudios se encuentra en la identificación de las concentraciones de transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en regiones específicas del parénquima cerebral de ratas normales sometidas al LCE, en comparación con otro grupo sometido al compuesto 2-deoxi-D-glucosa. Otra posibilidad, sería evaluar los efectos que puede tener la glicemia en los procesos mnemónicos ligados a eventos emocionales en modelos experimentales de Enfermedad de Alzheimer, lo cual en caso de obtenerse resultados positivos podría tener implicaciones en el tratamiento de este tipo de patologías.

En el estudio del consumo de oxígeno fue utilizada la aplicación de adrenalina para la inducción de un estado de estrés fisiológico, sin embargo, una posibilidad para futuros estudios sería utilizar el LCE como eventual estímulo aversivo en estos animales y medir los efectos que tiene sobre esta variable fisiológica. Adicionalmente, la medición de este parámetro de forma continua puede aportar una mayor solidez a las conclusiones obtenidas.

Por último, aunque en este trabajo solo fue mostrada la evaluación de los efectos ansiolíticos de tres nuevas moléculas derivadas de la tetrahydro-1-benzoazepina, esta línea continúa su desarrollo y al momento se han generado otros 7 nuevos compuestos que deben ser evaluados de igual forma. Así mismo, la utilización de

otros paradigmas experimentales puede aumentar la validez de los resultados obtenidos antes de entrar en fases más avanzadas de experimentación.

9. REFERENCIAS

- Adelman RD, Holliday M. Oxygen consumption in the azotemic rat. *Am J Clin Nutr*, v.30, p. 565-7, 1977
- Albarracín G, Rovira J, Rejas J. Economic and epidemiologic aspects of generalized anxiety disorder: a review of the literature. *Actas Esp Psiquiatr*, v. 36, p. 165-76, 2008
- Alexander G, Bell AW, Setchell BP. Regional distribution of cardiac output in young lambs: effect of cold exposure and treatment with catecholamines. *J Physiol*, v. 220, p. 511-28, 1972
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 4th ed.: DSM-IV-TR. Washington, D.C.2000
- Anderson WK, Lai G. Boron Trifluoride-Diethyl Ether Complex Catalyzed Aromatic Amino-Claisen Rearrangements. *Synthesis*, v. 10, p. 1287-1290, 1995
- Armario A, Gil M, Marti J, Pol O, Balasch J. Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav*, v.39, p .373-7, 1991
- Awad N, Gagnon M, Desrochers A, Tsiakas M, Messier C. Impact of peripheral glucoregulation on memory. *Behav Neurosci*, v.116, p. 691-702, 2002

- Báez AM, Ayala JO, Conde CA. Evaluación comportamental comparativa por género y selección genética de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado. *Salud uis*, v. 33, p. 191-201, 2001
- Baldi E, Bucherelli C. The inverted "u-shaped" dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. *Nonlinearity Biol Toxicol Med*, v. 1, p. 9-21, 2005
- Ball EG, Jungas RL. On the action of hormones which accelerate the rate of oxygen consumption and fatty acid release in rat adipose tissue in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 15, p. 932-41, 1961
- Benedict F, MacLeod G. The Heat Production of the Albino Rat I. Technique, Activity Control, and the Influence of Fasting. *Nutr*, v. 1, p. 343-66, 1929.
- Benthem L, Van Der Leest J, Meeuwsen WP, Van Der Molen H, Zock JP, Zijlstra WG, Steffens AB. The effect of epinephrine on oxygen consumption, overall energy metabolism, and substrate utilization in rats. *Adv Exp Med Biol*, v.277, p. 851-60, 1990
- Benton D, Owens DS. Blood glucose and human memory. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 113, p. 83-8, 1993
- Bertoglio LJ, Carobrez AL. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav Brain Res*, v. 108, p. 197-203, 2000
- Blanchard DC & Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*, v. 39, p. 43– 68, 1988.

- Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ, Blanchard DC. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res*, v. 1-2, p. 155-65, 1993
- Blake TM, Varnhagen CK, Parent MB. Emotionally arousing pictures increase blood glucose levels and enhance recall. *Neurobiol Learn Mem*, v. 75, p. 262-73, 2001
- Bonsignore LT, Chiarotti F, Alleva E, Cirulli F. Assessing the interplay between fear and learning in mice exposed to a live rat in a spatial memory task (MWM). *Anim Cogn*, v. 11, p. 557-62, 2008
- Botelho S, Albarracín AP, Chona BH, Conde CA, Tomaz C. Estudio correlacional entre memoria declarativa y una prueba psicometría en una muestra de adolescentes escolares de la ciudad de Bucaramanga. *Colomb Méd*, v. 39, p. 60-70, 2008a
- Botelho S, Acevedo LM, Conde CA, Fandiño J, Tomaz C. Evaluación de la memoria declarativa asociada con contenido emocional en pacientes lobectomizados. *Rev Latinoamericana Psicol*, v. 40, p. 229-241, 2008b
- Bowery NG, Hudson AL, Price GW. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience*, v. 20, p. 365-83, 1987
- Bramante PO. Quantitation of oxygen consumption and spontaneous muscular activity of the rat. *J Appl Physiol*, v. 16, p. 982-990, 1961
- Bruder N, Stoedeur JM, Ravussin P, Valli M, Dufour H, Bruguerolle. et al. Metabolic and hemodynamic changes during recovery and tracheal extubation

in neurosurgical patients: immediate versus delayed recovery. *Anesth Analg*, v. 89, p. 674-8, 1999

- Buchanan TW, Lovallo WR. Enhanced memory for emotional material following stress-level cortisol treatment in humans. *Psychoneuroendocrinology*, v. 26, p. 307-317, 2001
- Cahill L, Prins B, Weber M, McGaugh JL. Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. *Nature*, v. 371, p. 702-4, 1994
- Cahill L, McGaugh JL. A novel demonstration of enhanced memory associated with emotional arousal. *Conscious Cogn*, v. 4, p. 410-21, 1995
- Cahill L, Haier RJ, Fallon J, Alkire MT, Tang C, Keator D. et al. Amygdala activity at encoding correlated with long-term, free recall of emotional information. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 8016-21, 1996
- Cahill L. Interactions between catecholamines and the amygdala in emotional memory: subclinical and clinical evidence. *Adv Pharmacol*, v. 42, p. 964-7, 1998
- Cahill L, Akire MT. Epinephrine enhancement of human memory consolidation: interaction with arousal at encoding. *Neurobiol Learn Mem*, v. 79, p. 194-198, 2003
- Cain ME, Saucier DA, Bardo MT. Novelty seeking and drug use: contribution of an animal model. *Exp Clin Psychopharmacol*, v. 13, p. 367-75, 2005
- Cameron MA. The action of nitrophenols on the metabolic rate of rats. *Br J Pharmacol Chemother*, v. 13, p. 25-9, 1958

- Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 29, p. 1193-205, 2005
- Cerezo J, García B. Influencia del peso y la temperatura sobre el consumo de oxígeno de rutina del Dentón común (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Revista Aquatic*, v. 21, p. 16-23, 2004
- Cohen RA, Albers HE. Disruption of human circadian and cognitive regulation following a discrete hypothalamic lesion: a case study. *Neurology*, v. 41, p. 726-9, 1991
- Conde C, Costa V, Tomaz C. Measuring emotional memory in the elevated T-maze using training to criterion procedure. *Pharmacology Biochem Behav*, v. 63, p. 63-69, 1999
- Conde C, Costa V, Tomaz C. Un conjunto de programas para el registro y procesamiento de datos comportamentales en investigación de fisiología y farmacología. *Biotemas*, v. 13, p. 145-159, 2000
- Conde C, Tomaz C, Botelho S. Papel de la amígdala en la ponderación de la severidad del estímulo aversivo: su relación con la memoria emocional en modelos comportamentales. *Salud UIS*, v. 33, p. 245-259, 2001a
- Conde C, Ayala JO, Botelho S, Herrera AB, Velásquez MA. La vía visual puede ser el disparador de la angiogenicidad en el modelo del laberinto en cruz elevado. *Salud uis*, v. 35, p. 190-195, 2001b

- Conde C, Prada EL, Martínez LM, Botelho S, Tomaz C. Evaluación de las manifestaciones autonómicas asociadas a la aplicación de una prueba auditivo-visual de memoria emocional en humanos. *Univ Psychol*, v. 7, p. 109-124, 2008
- Dal-Cól M, Pereira L, Rosa V, Calixto A, Carobrez AP, Faria M. Lack of midazolam- induced anxiolysis in the elevated plus maze trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 74, p. 395-400, 2003
- Danneberg P, Weber KH. Chemical structure and biological activity of the diazepines. *Br J Clin Pharmacol*, Suppl2, p. 231S-244S, 1983
- Dawson GR, Crawford SP, Collinson N, Iversen SD, Tricklebank MD. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 3, p. 316-23, 1995a
- Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci*, v. 2, p. 33-6, 1995b
- De Kloet ER, Jöels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, v. 6, p. 463-75, 2005
- Delgado H. Efectos del bloqueo del sistema nervioso autónomo periférico sobre la memoria emocional y la ansiedad evaluadas en el laberinto en cruz elevado [tesis de Maestría]. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Salud; 2008. 46 p.
- De- Mello D & Carobrez AP. Elevated T- maze as an animal model of memory: effects of scopolamine. *Behav Pharmacol*, v. 13, p. 139-148, 2002

- Eintrei C, Sokoloff L, Smith CB. Effects of diazepam and ketamine administered individually or in combination on regional rates of glucose utilization in rat brain. *Br J Anaesth.* v. 82, p. 596-602, 1999
- Espejo EF. Structure of the mouse behavior on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav Brain Res,* v. 86, p. 105-112, 1997
- Esquivel CG, Velasco VM, Martínez E, Barbachano E, González G, Castillo CE. Coeficiente de correlación intraclase vs correlación de Pearson de la glucemia capilar por reflectometría y glucemia plasmática. *Med Int Mex,* v. 22, p. 165-71, 2006
- File SE, Mabbutt PS, Hitchcott PK. Characterization of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl),* v. 1, p. 98-101, 1990a
- File SE. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology (berl),* v. 100, p. 281-2, 1990b
- File SE. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behav Brain Res,* v. 58, p. 199-202, 1993
- File SE, Zangrossi H Jr; Sanders FL, Mabbutt PS. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl),* v. 113, p. 543-6, 1994
- Frank JE, Tomaz C. Enhancement of declarative memory associated with emotional content in a Brazilian sample. *Braz J Med Biol Res,* v. 33, p. 1483-9, 2000

- Fontela JÁ, Gato A, Marini L, Palma A, Gómez SL, Yépez AF. Anxiolytic-like effects of azepine derivates. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*, v. 109, p. 109, 2006
- Foster JK, Lidder PG, Süram SI. Glucose and memory: fractionation of enhancement effects? *Psychopharmacology (Berlin)*, v. 137, p. 259-70, 1998
- Fricchione G. Clinical practice generalized anxiety disorder. *N Engl Med*, v. 35, p. 675-82, 2004
- Friedman BH. Feelings and the body: The Jamesian perspective on autonomic specificity of emotion. *Biol Psychol*, Oct 29, 2009.
- Gareri P, Falconi U, De Fazio P, De Sarro G. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. *Prog Neurobiol*, v. 61, p. 353-96, 2000
- Ghizoni DM, Joao LM, Moratelli Neto L, da Cunha IC, Orlandi Pereira L, Borges FR. et al. The effects of metabolic stress and vagotomy on emotional learning in an animal model of anxiety. *Neurobiol Learn Mem*, v. 86, p. 107-16, 2006
- Gold PE. Role of glucose in regulating the brain and cognition. *Am J Clin Nutr*, v. 61, p. 987S-995S, 1995. Review
- Gold PE. Glucose and age-related changes in memory. *Neurobiol Aging*, v. 26, p. suppl 60-4, 2005
- Gómez-Ayala SL, Stashenko E, Palma A, Amaro-Luis M. Sequential amino-Claisen Rearrangement / Intramolecular 3+2-Dipolar Cycloaddition / Reductive Cleavage Approach to the Stereoselective Synthesis of cis-4-hydroxy-2-aryl-2,3,4,5-tetrahydro-1(1H)-benzazepines. *Synlett*, v. 14, p. 2275-77, 2006

- Graf P, Schacter DL. Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn*, v. 11, p. 501-18, 1985
- Greenblatt DJ, Shader RI, Divoll M, Harmatz JS. Benzodiazepines: a summary of pharmacokinetic properties. *Br J Clin Pharmacol*, v. 11, p. Suppl 1:11S-16S, 1981
- Griebel G, Perrault G, Tan S, Schoemaker H, Sanger DJ. Pharmacological studies on synthetic flavonoids: comparison with diazepam. *Neuropharmacology*, v. 7, p. 965-77, 1999
- Hall JL, Gold PE. The effects of training, epinephrine, and glucose injections on plasma glucose levels in rats. *Behav Neural Biol*, v.46, p. 156-67, 1986
- Hall JL, Goder-Frederick LA, Chewning WW, Silveira J, Gold PE. Glucose enhancement of performance on memory tests in young and aged humans. *Neuropsychologia*, v. 27, p. 1129-38, 1989
- Hall JL, Gold PE. Plasma glucose levels predict the disrupting effects of adrenoceptor antagonists on enhancement of memory storage. *Eur J Pharmacol*, v. 20, p. 365-70, 1992
- Heim T, Hull D. The effect of ptopanalol on the calorogenic response in brown adipose tissue of new-born rabbits to catecholamines, glucagon, corticotrophin and cold exposure. *J Physiol*, v. 187, p. 271-83, 1966
- Heninger C, Saito N, Tallman JF, Garrett KM, Vitek MP, Duman RS. et al. Effects of continuous diazepam administration on GABAA subunit mRNA in rat brain. *J molec. Neurosci*, v. 2, p. 101-107, 1990

- Herbert J, Goodbyer IM, Grossman AB, Hastings MH, de Kloet ER, Lightman SL. et al. Do corticosteroids damage the brains? *J Neuroendocrinol*, v. 18, p. 393-411, 2006
- Himsworth RL. Compensatory reactions to a lack of metabolizable glucose. *J Physiol*, v. 198, p. 451-65, 1968
- Hodges H. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Cognitive Brain Research*, v. 3, p. 167 – 181, 1996
- Holmes A, Rodgers RJ. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav*, v. 60, p. 473-88, 1998
- Holmes A, Rodgers RJ. Prior exposure to the elevated plus-maze sensitizes mice to the acute behavioral effects of fluoxetine and phenelzine. *Eur J Pharmacol*, v. 2-3, p. 221-30, 2003
- Hulks G, Mohammed AF, Jardine AG, Connell JM, Thomson NC. Circulating plasma concentrations of atrial natriuretic peptide and catecholamines in response to maximal exercise in normal and asthmatic subjects. *Thorax*, v. 46, p. 824-8, 1991
- Idris N, Neill J, Grayson B, Bang-Anderson B, Witten LM, Brennum LT. et al. Sertindole improves sub-chronic PCP-induced reversal learning and episodic memory deficits in rodents: involvement of 5-HT(6) and 5-HT(2A) receptor mechanisms. *Psychopharmacology*, v. 208, p. 23–36, 2010
- Javaid JI. Clinical pharmacokinetics of antipsychotics. *J Clin Pharmacol*, v. 34, p. 286-95, 1994

- Jefferys D, Funder JW. The forced swimming test: effects of glucose administration on the response to food deprivation and adrenalectomy. *Eur J Pharmacol*, v. 205, p. 267-9, 1991
- Joels M. Corticosteroid actions in the hippocampus. *J Neuroendocrinol*, v. 13, p. 657-669, 2001
- Karapolat H, Eyigor S, Durmaz B, Yagdi T, Nalbantgil S, Karakula S. The relationship between depressive symptoms and anxiety and quality of life and functional capacity in heart transplant patients. *Clin Res Cardiol*, v. 96, p. 593-9, 2007
- Katzung BG. Sedative-hypnotic drugs. In: *Basic and clinical pharmacology*, 8th edition. USA: The McGraw Hill Companies, Inc, p. 364–381, 2001
- Kelly PA, Ford I McCulloch J. The effect of diazepam upon local cerebral glucose use in the conscious rat. *Neuroscience*, v. 19, p. 257-65, 1986
- Kensinger EA. Remembering emotional experiences: the contribution of Valence and arousal. *Ver Neurosci*, v. 15, p. 241-251, 2004
- Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci*, v. 3, p. 453-62, 2002
- Kjeldergaad PM. PAVLOV: an information retrieval program for the analysis of learning data. *Psychol Rep*, v. 21, p. 837-41, 1967
- Kopf SE, Baratti CM. Effects of posttraining administration of glucose on retention of a habituation response in mice: participation of a central cholinergic mechanism. *Neurobiol Learn Mem*, v. 65, p. 253-60, 1996

- Korol DL, Gold PE. Glucose, memory, and aging. *Am J Clin Nutr*, v. 67, p. 764S-771S, 1998 Review.
- Labar KS, Cabeza R. Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nat Rev Neurosci*, v.7, p.54-64, 2006
- Lamprea MR, García AM, Morato S .Effects of reversible inactivation of the medial septum on rat exploratory behavior in the elevated plus-maze using a test-retest paradigm. *Behav Brain Res*, v. 1, p. 67-73, 2010
- Lebrun CM, McKenzie DC, Prior JC, Taunton JE. Effects of menstrual cycle phase on athletic performance. *Med Sci Sports Exerc*, v. 27, p. 437-44, 1995
- Ledoux JE. Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res*, v. 58, p. 69-79, 1993
- Ledoux JE. Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol*, v. 46, p. 209-35, 1995. Review
- Lehninger ND. *Principles of Biochemistry*, Hardcover Apr 23, 4ta edition, 2004
- Lieb R, Becker E, Altamura C. The epidemiology of generalized disorder in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 15, p. 445-52, 2005
- Lundholm L, Svedmyr N. Studies on the stimulating effects of adrenaline and noradrenaline on respiration in man. *Acta Physiol Scand*, v.67, p. 65-75, 1966
- Luz J, Griggio MA. Effects of aging on the energy balance of pregnant rats. *Ann Nutr Metab*, v. 42, p. 237-43, 1998

- Macdonald RL, Olsen RW. GABAA receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci*, v. 17, p. 569-602, 1994
- Malin EL, McGaugh JL. Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 1959-63, 2006
- Mandile P, Giuditta A, Romano F, Montagnese P, Piscopo S, Cotugno M. et al. Waking EEG power spectra in the rat: correlations with training performance. *Cognitive Brain Resear*, v. 17, p. 94–105, 2003
- Manning CA, Ragozzino ME, Gold PE. Glucose enhancement of memory in patients with senile dementia of the alzheimer´s type, v. 14, p. 523-8, 1993
- Márquez C, Nadal R, Armario A. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses t daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience*, v. 123, p. 601-12, 2004
- Masaoka Y, Homma I. Expiratory time determined by individual anxiety levels in humans. *J Appl Physiol*, v. 86, p. 1329-36, 1999
- Maxwell GM, Smyth C, Harvey G, Crompton S. Diurnal variation in oxygen consumption of laboratory rats. *Aust J Exp Biol Med Sci*, v. 63, p. 73-75, 1985
- Mcewen BS. Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry*, v. 54, p. 200-207, 2003
- McGaugh JL, Gold PE, Van Buskirk R, Haycock J. Modulating influences of hormones and catecholamines on memory storage processes. *Prog Brain Res*, v. 42, p. 151-62, 1975

- McGaugh JL. Memory--a century of consolidation. *Science*, v. 287, p. 248-51, 2000
- Mcgaugh JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Ver Neurosci*, v. 27, p. 1-28, 2004
- McIntyre CK, Marriott LK, Gold PE. Patterns of brain acetylcholine release predict individual differences in preferred learning strategies in rats. *Neurobiol Learn Mem*, v. 79, p. 177–183, 2003
- McNay EC, McCarty RC, Gold PE. Fluctuations in brain glucose concentration during behavioral testing dissociations between brain areas and between brain and blood. *Neurobiol Learn Mem*, v. 75, p. 325-37, 2001
- McNay EC, Gold PE. Food for thought: fluctuations in brain extracellular glucose provide insight into the mechanisms of memory modulation. *Behav Cogn Neurosci Rev*, v. 1, p. 264-80, 2002
- Medrano RT. Diagnóstico del nivel de Máximo Consumo de Oxígeno (MVO₂) en los adultos mayores del municipio de Camagüey. Facultad de Cultura Física de Camagüey. (Consultado 04/04/2010) Disponible en: <http://afide.inder.cu/PDF/AREA%201/AFC/AFC016.pdf>
- Mello DM, Marcinichen DR, Madruga D, Branco R, Paschoalini MA, De Lima TC. Involvement of NK1 receptors in metabolic stress markers after the central administration of substance P. *Behav Brain Res*, v. 181, p. 232-8, 2007
- Messier C, Gagnon M. Glucose regulation and cognitive functions: relation to Alzheimer's disease and diabetes. *Behav Brain Res*, v. 75, p. 1-11, 1996

- Messier C. Glucose improvement of memory: a review. *Eur J Pharmacol*, v. 490, p. 33-57, 2004
- Messner-Pellenc P, Ximenes C, Brasileiro CF, Mercier J, Grilleau R, P´refaut CG. Cardiopulmonary exercise testing. Determinants of dyspnea due to cardiac or pulmonary limitation. *Chest*, v. 106, p. 354-60, 1994
- Milner B, Squire LR, Kandel ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, v. 20, p. 445-68, 1998
- MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Estudio nacional de salud Mental, Colombia. República de Colombia. 2003. (Consultado 20/02/2010) Disponible en: [http://www.minproteccionsocial.gov.co/VBeContent/NewsDetail.asp?ID=14822 &IDCompany](http://www.minproteccionsocial.gov.co/VBeContent/NewsDetail.asp?ID=14822&IDCompany).
- Montgomery KC. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol*, v. 48, p. 254-60, 1955
- Mortola JP. Breathing around the clock: an overview of the circadian pattern of respiration. *Eur J Appl Physiol*, v. 91, p. 119-29, 2004
- Mortola JP. Correlations between the circadian patterns of body temperature, metabolism and breathing in rats. *Respir Physiol Neurobiol*, v. 15, p. 137-46, 2007
- Murahashi SI, Mitsui H, Tsuda T, Watanabe S. Tungstate-catalyzed oxidation of secondary amines to nitrones alpha-sustitution of secondary amines via nitrones. *J Org Chem*, v. 6, p. 1736-1744, 1990

- Nagai K, Nishio T, Nakagawa H. Bilateral lesions of suprachiasmatic nucleus eliminate circadian rhythms of oxygen consumption and the respiratory quotient in rats. *Experientia*, v. 41, p. 1136-8, 1985
- Newcomer JW, Craft S, Fucetola R, Moldin SO, Selke G, Paras L. et al. Glucose-induced increase in memory performance in patients with schizophrenia. *Schizophr Bull*, v. 25, p. 321-35, 1999
- Nonogaki K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*, v. 43, p.533-49, 2000.
- Nordby T, Torras-García M, Portell-Cortes I, Costa-Miserachs D. Posttraining epinephrine treatment reduces the need for extensive training. *Physiology & Behavior*, v. 89, p. 718–723, 2006
- Nutt DJ. Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. *CNS Spectr*, v. 1, p. 49-56, 2005
- Ohira Y, Koziol BJ, Edgerton VR, Brooks GA. Oxygen consumption and work capacity in iron-deficient anemic rats. *J Nutr*, v. 111, p. 17-25, 1981
- Organización Mundial de la salud. Informe sobre la salud en el mundo 2001 - Salud mental: nuevos conocimientos, nuevas esperanzas. (Consultado 15/01/2010) Disponible en: <http://www.who.int/whr/2001/es/index.html>.
- Parsons MW, Gold PE. Glucose enhancement of memory in elderly humans: an inverted-U dose-response curve. *Neurobiol Aging*, v. 13, p. 401-4, 1992

- Pate RR, Sparling PB, Wilson GE, Cureton KJ, Miller BJ. Cardiorespiratory and metabolic responses to submaximal and maximal exercise in elite women distance runners. *Int J Sports Med*, v. 8, suppl 2 p. 91-5, 1987
- Pellow S, Chopin P, File S, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, v. 14, p. 149-167, 1985
- Pych JC, Kim M, Gold PE. Effects of injections of glucose into the dorsal striatum on learning of place and response mazes. *Behavioural Brain Research*, v. 167, p. 373–378, 2006
- Ramanathan M, Jaiswal AK, Bhattacharya SK. Differential effects of diazepam on anxiety in streptozotocin induced diabetic and non-diabetic rats. *Psychopharmacology (Berl)*. v.135, p. 361-7, 1998
- Ramos JM. Preserved learning about allocentric cues but impaired flexible memory expression in rats with hippocampal lesions. *Neurobiol Learn Mem*, v. 93, p. 506-14, 2010
- Reims HM, Sevre K, Fossum E, Høieggen A, Eide I, Kjeldsen SE. Plasma catecholamines, blood pressure responses and perceived stress during mental arithmetic stress in young men. *Blood Press*, v. 13, p. 287-94, 2004
- Rex A, Bert B, Fink H, Voigt JP. Stimulus-dependent changes of extracellular glucose in the rat hippocampus determined by in vivo microdialysis. *Physiol Behav*, v. 98, p. 467-73, 2009

- Rich N, Reyes P, Reap L, Goswami R, Fraley GS. Sex differences in the effect of prepubertal GALP infusion on growth, metabolism and LH secretion. *Physiol Behav*, v. 92, p. 814-23, 2007
- Rodgers RJ, Johnson NJ, Cole JC, Dewar C, Kidd GR, Kimpson PH. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockage. *Pharmacol Biochem Behav*. v. 54, p. 41-50, 1996
- Rodgers R, Dalvi A. Anxiety, defense and the elevated plus-maze. *Neuroscience and biobehavioral Reviews*, v. 21, p. 801-810, 1997
- Rodgers RJ. Animal models of anxiety: where next? *Behav Pharmacol*, v. (6-7):477-96; discussion 497-504, 1997
- Rodríguez T, Malvezzi M, Chatenoud L, Bosetti C, Levi F, Negri E. et al. Trends in mortality from coronary heart and cerebrovascular disease in the Americas: 1970-2000. *Heart*, v. 92, p. 453-460, 2006.
- Rosa VP, Vandresen N, Calixto AV, Kovaleski DF, Faria MS. Temporal analysis of the rats behaviour in the plus-maze: effect of midazolam. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 67, p. 177-82, 2000.
- Salinas JA, Packard MG, McGaugh JL. Amygdala modulates memory for changes in reward magnitude: reversible post-training inactivation with lidocaine attenuates the response to a reduction in reward. *Behav Brain Res*, v. 59, p. 153-9, 1993

- Salinas JA, McGaugh JL. The amygdala modulates memory for changes in reward magnitude: involvement of the amygdaloid GABAergic system. *Behav Brain Res*, v. 80, p. 87-98, 1996
- Schacter DL. Implicit expressions of memory in organic amnesia: learning of new facts and associations. *Hum Neurobiol*, v. 6, p. 107-18, 1987
- Schacter DL, Cooper LA. Implicit and explicit memory for novel visual objects: structure and function. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn*, v. 19, p. 995- 1009, 1993
- Shuhama R, Del-Ben CM, Loureiro SR, Graeff FG. Animal defense strategies and anxiety disorders. *Acad Bras Cienc*, v. 79, p. 97-109, 2007
- Solnica B, Naskalski JW, Sieradzki J. Analytical performance of glucometers used for routine glucose self-monitoring of diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*, v. 331, p. 29-35, 2003
- Squire LR. Mechanisms of memory. *Science*, v. 232, p. 1612-9, 1986
- Stallknecht B, Lorentsen J, Enevoldsen LH, Bulow J, Biering-Sorensen F, Galbo H. et al. Role of the sympathoadrenergic system in adipose tissue metabolism during exercise in humans. *J Physiol*, v. 536, p. 283-94, 2001
- Stephenson FA. Understanding the GABAA receptor: a chemically gated ion channel. *Biochem J*, v. 249, p. 21-32, 1988
- Stephenson R, Liao KS, Hamrahi H, Horner RL. Circadian rhythms and sleep have additive effects on respiration in the rat. *J Physiol*, v. 536, p. 225-35, 2001

- Tobin MJ, Chadha TS, Jenouri G, Birch SJ, Gazeroglu HB, Sackner MA. Breathing patterns. 2. Diseased subjects. *Chest*, v. 3, p. 286-94, 1983
- Tomaz C, Dickinson-Anson H, McGaugh JL, Souza-Silva MA, Viana MB, Graeff FG. Localization in the amygdala of the amnesic action of diazepam on emotional memory. *Behav Brain Res*, v. 58, p. 99-105, 1993
- Tomaz C & Costa JC. Neurociências e memória. *Neurociências e memória*, p. 145 – 160, 2000
- Tomaz C, Frank JE, Conde C. Integrative function of the amygdale in emotional memory storage. *International Congress Series*, v. 1250, p. 335-346, 2003
- Torres AM, Quintero JC, Atehortúa L. Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno en microorganismos incluyendo el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, v.43, p. 33-41, 2008
- Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 44, p. 463-469, 1993
- Uribe C, Velásquez MA, Conde CA. Efecto de manipulación-exposición y la resocialización sobre la actividad exploratoria y la memoria de ratas expuestas al campo abierto. *Salud UIS*, v. 34, p. 146-153, 2002
- Velásquez MC, Uribe C, Botelho S, Ortiz JG, Conde C, Tomaz C. Effects of handling on elevated plus-maze behavior and [³ H] Flunitrazepam. *Neurobiologia*, v. 73, p. 9-17, 2009

- Verago JL, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in footshock-stressed rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 34, p. 1197-207, 2001
- Weiss SM, Wadsworth G, Fletcher A, Dourish CT. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 23, p. 265-271, 1998
- West SJ, Goedecke JH, van Niekerk L, Collins M, St Clair Gibson A, Macdonald IA. et al. Effects of elevated plasma adrenaline levels on substrate metabolism, effort perception and muscle activation during low-to-moderate intensity exercise. *Pflugers Arch*, v. 451, p. 727-37, 2006
- Whiting MD, Hamm RJ. Mechanisms of anterograde and retrograde memory impairment following experimental traumatic brain injury. *Brain Research*, v. 1213, p. 69-77, 2008
- Williams CL, McGaugh JL. Reversible lesions of the nucleus of the solitary tract attenuate the memory-modulating effects of posttraining epinephrine. *Behav Neurosci*, v. 107, p. 955-62, 1993
- Winocur G, Gagnon S. Glucose treatment attenuates spatial learning and memory deficits of aged rats on tests of hippocampal function. *Neurobiol Aging*, v. 19, p. 233-41, 1998
- Winter S, Dieckmann M, Schwabe K. Dopamine in the prefrontal cortex regulates rats behavioral flexibility to changing reward value. *Behav Brain Res*, v. 198, p. 206-13, 2009

- Yamaoka I, Nakayama M, Miki T, Yokayama T, Takeuchi Y. Dietary protein modulates circadian changes in core body temperature and metabolic rate in rats. *J Physiol Sci*, v. 58, p. 75-81, 2008
- Yamaoka I, Hagi M, Doi M. Circadian changes in core body temperature, metabolic rate and locomotor activity in rats on a high-protein, carbohydrate-free diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, v.55, p. 511-7, 2009
- Yépez AF, Palma A, Stashenko E, Bahsas A, Amaro-Luis JM. 2-Allyl- N-benzyl substituted a-naphthylamines as building blocks in heterocyclic synthesis. New and efficient syntheses of benz[e]naphtho[1,2-b]azepine and naphtho[1,2-b]azepine derivatives. *Tetrahedron Lett*, v. 47, p. 5825-28, 2006
- Ymer S, Schofield PR, Shivers BD, Pritchett BD, Luddens H, Kohler M. et al. Molecular studies of the GABAA receptor. *J Protein Chem*, v.3, p. 352-55, 1989
- Zurita R. Diferencias significativas entre el hombre y la mujer deportista en cuanto a la capacidad de rendimiento deportivo. *Innovación y experiencias educativas* ISSN 1988-6047, v. 17, p. 1-8, abril de 2009