

**EFFECTOS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO
PERIFÉRICO SOBRE LA MEMORIA EMOCIONAL Y LA ANSIEDAD
EVALUADAS EN EL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO**

HERNÁN DARÍO DELGADO RICO, MD

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD.
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA, 2008**

**EFFECTOS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO
PERIFÉRICO SOBRE LA MEMORIA EMOCIONAL Y LA ANSIEDAD
EVALUADAS EN EL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO**

HERNÁN DARÍO DELGADO RICO, MD

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

Director
CARLOS ARTURO CONDE COTES, MD, Ph.D.
Profesor Titular
Facultad de Salud UIS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD.
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA, 2008**

Dedicado A:

A mi esposa, Ruby Jackeline, por su comprensión y apoyo durante todo este tiempo que también ha significado donarme buena parte de su tiempo, por sus palabras y acciones de aliento y esperanza, por acompañarme en mis proyectos y por la bella bendición que está creciendo en su interior, Verónica.

A mis padres, Hernán y Cecilia por su amor incondicional y esfuerzo en enseñarme el valor de las obras bien hechas y en permitirme todas las condiciones a su alcance para lograr mis anhelos.

A mi hermana, Andrea Carolina, por ser fuente de paz y alegría, esperanza futura.

A Dios, en quien siempre confío, porque me ha dotado de todo lo necesario para alcanzar mis metas y siempre ha sido mi más solícito y fiel amigo.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar sus agradecimientos a todas las personas que han contribuido en la realización de éste proyecto de Maestría:

A la **Universidad Industrial de Santander** y a la **Vicerrectoría de Investigación y Extensión**, por la financiación parcial de este proyecto de investigación que ha sido una gran oportunidad orientada al desarrollo profesional y la búsqueda de conocimientos nuevos.

Al **Dr. Carlos Arturo Conde Cotes PhD**, mi director de tesis y guía durante todo éste proceso, por ser luz en mi especialización como Maestro en Ciencias Biomédicas, por su paciencia y confianza en mis capacidades que permitió enfrentarme a retos que quizás otros habrían archivado en el cajón.

Al señor **Jesús Rodríguez**, técnico del Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, por toda su colaboración libre de intereses durante la ejecución de éste proyecto; así mismo a los Sres. **Octavio Santos** y **Octavio Mantilla** por su ayuda en algunas etapas del mismo.

Al **personal del grupo de Neurociencias y Conducta UIS – UPB** con quienes compartí buena parte de estos últimos años, por todas sus contribuciones académicas y personales, que Dios les acompañe siempre.

A las personas que confiaron en mis capacidades y ayudaron oportunamente desde sus posibilidades con pequeños esfuerzos que al final sumaron enormes contribuciones para llevar a cabo mi postgrado y cumplir cabalmente con mi labor clínica: personal paramédico (*David V. y Sandra A.*) y personal profesional (*Dr. E. Gallo, Dra. P. Mahecha; Médicos: Dr. J. Polo, Dr. L. Niño y demás colegas*) de la Clínica Guane de Floridablanca; así mismo a SUSALUD E.P.S. y a Sanimed Ltda.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	16
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	19
4. OBJETIVOS	21
5. MARCO TEÓRICO	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	44
7. RESULTADOS	61
8. DISCUSION	88
9. CONCLUSIONES	103
10. RECOMENDACIONES.....	104
11. PERSPECTIVAS	105
12. REFERENCIAS	106

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de análisis de variabilidad en dominio del tiempo para el electrocardiograma.	43
Tabla 2. Distribución de los grupos de animales acorde a la dosis de Adrenalina utilizada en el experimento 3, etapa 1.	52
Tabla 3. Distribución de los grupos de animales acorde a la sustancia utilizada en el experimento 3, etapa 2.	53
Tabla 4. Distribución de los grupos de animales acorde a la sustancia utilizada en el experimento 4 etapa 1, con sus respectivas dosis.	55
Tabla 5. Distribución de los grupos de animales acorde a la sustancia utilizada en el experimento 4 etapa 2, con sus respectivas dosis.	56
Tabla 6. Descripción de sustancias y dosis utilizadas en la etapa 2 del experimento 4.	58
Tabla 7. Parámetros de análisis de variabilidad en los electrocardiogramas de las ratas.	59
Tabla 8. Parámetros de análisis de variabilidad en los registros de comportamiento de las ratas.	59
Tabla 9. Resumen de las variables y sus correspondientes mediciones estadísticas.	61
Tabla 10. Resumen de las variables analizadas en el experimento con inyección de Solución Salina.	62
Tabla 11. Valores de prueba “t” pareada y de “p” para las diferencias de la frecuencia cardiaca.	64
Tabla 12. Valores de prueba “t” pareada y de “p” para las diferencias de la frecuencia respiratoria.	64
Tabla 13. Valores de prueba “t” pareada y de “p” para las diferencias de las frecuencias respiratorias.	65
Tabla 14. Resultados significativos de ANOVA de 2 vías (período y tratamiento) para cada una de las variables fisiológicas.	66
Tabla 15. Valores de la prueba de comparaciones múltiples (Bonferroni) para el VO ₂	70
Tabla 16. Resultados del análisis de los pNNx (ANOVA de dos vías).	71
Tabla 17. Comparaciones de los %nNEG y %nPOS entre Tratamiento y Periodo.	72
Tabla 18. Comparación de TTO y SES en relación al TBA.	73
Tabla 19. Comparación de TTO y SES en relación al %TBA.	73
Tabla 20. Diferencias significativas en la frecuencia cardiaca entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.	76
Tabla 21. Diferencias significativas en la frecuencia respiratoria entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.	77

Tabla 22. Diferencias significativas en el consumo de oxígeno entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.....	78
Tabla 23. Diferencias significativas en el promedio de los intervalos R-R para los grupos del experimento 4.....	79
Tabla 24. Diferencias significativas en la mediana de los intervalos R-R para cada grupo y periodo del experimento 4.....	80
Tabla 25. Resultados del análisis de los pNNx del experimento 4 (ANOVA de dos vías).....	82
Tabla 26. Diferencias significativas en el promedio del mínimo intervalo R-R para cada grupo y periodo del experimento 4.	83
Tabla 27. Diferencias significativas en la actividad motora durante el experimento número 4.	85
Tabla 28. Resultados de ANOVA de 2 factores sobre las variables comportamentales del experimento número 4.	85
Tabla 29. Resultados de las pruebas t pareadas comparando entradas y tiempo en el brazo abierto del laberinto en el experimento número 4.....	86

LISTA DE GRÁFICAS.

Figura 1. Taxonomía de la memoria y estructuras cerebrales asociadas	29
Figura 2. Diseño esquemático del Laberinto en Cruz Elevado (LCE) con sus respectivas dimensiones.	46
Figura 3. Fotografía de una sesión experimental en el Laberinto en Cruz Elevado.	46
Figura 4. Fotografía del montaje con el polígrafo Nihon Kohden.	47
Figura 5. Fotografía del montaje de la cámara hermética para registrar el consumo de oxígeno.	49
Figura 6. Diseño operativo del experimento número 2.	51
Figura 7. Diseño operativo del experimento número 3, etapa 1.	53
Figura 8. Diseño operativo del experimento número 3, etapa 2.	54
Figura 9. Diseño operativo del experimento número 4, etapa 1.	55
Figura 10. Esquema operativo del experimento número 4 etapa 2.	57
Figura 11. Divisiones del LCE para el análisis de comportamiento.	60
Figura 12. Diferencias pareadas de la FC durante los períodos post inyección (PI) y minuto 30 (M30) con respecto a la FC basal para cada dosis de adrenalina evaluada.	64
Figura 13. Promedio de los intervalos R-R \pm EEM de los diferentes grupos y etapas del experimento.	67
Figura 14. Comparación de la frecuencia relativa acumulada de los distintos intervalos R-R entre los 2 grupos de tratamientos.	68
Figura 15. Comparación de la mediana de los intervalos R-R dentro de cada periodo experimental.	68
Figura 16. Promedio \pm EEM de la FC para las diferentes etapas y sustancias administradas a las ratas.	69
Figura 17. Promedio \pm EEM de los intervalos R-R para las diferentes etapas y sustancias administradas a las ratas.	70
Figura 18. Promedio \pm EEM de EBA para los diferentes tratamientos y sesiones.	74
Figura 19. Promedio \pm EEM de EBA para los diferentes tratamientos y sesiones discriminado por lugares.	75
Figura 20. Promedio \pm EEM de la frecuencia cardiaca entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.	76
Figura 21. Promedio \pm EEM de la frecuencia respiratoria entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.	77
Figura 22. Promedio \pm EEM del consumo de oxígeno entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.	78
Figura 23. Promedio de los intervalos R-R para los grupos del experimento 4.	79

Figura 24. Diferencias significativas en la frecuencia relativa acumulada de los distintos intervalos R-R entre los grupos de tratamiento durante el periodo de minuto 15 pos-inyección.	80
Figura 25. Diferencias significativas en la frecuencia relativa acumulada de los distintos intervalos R-R entre los grupos de tratamiento durante el periodo post-laberinto en cruz elevado.	81
Figura 26. Diferencias significativas en el promedio del intervalo mínimo para cada uno de los grupos del experimento 4.	83
Figura 27. Efectos “mnemónicos” y actividad locomotora expresados por los cruzamientos dentro del LCE para el experimento número 4.	84
Figura 28. Diferencias significativas y efectos “mnemónicos” expresados en el tiempo en el brazo abierto (TBA) del experimento número 4.	87
Figura 29. Diferencias significativas y efectos “mnemónicos” expresados en las entradas al brazo abierto (EBA) del experimento número 4.	87

GLOSARIO

- ❖ **AD:** Adrenalina.
- ❖ **AMPc:** monofosfato cíclico de adenosina.
- ❖ **ANOVA:** análisis de varianza.
- ❖ **AT:** Atenolol.
- ❖ **BA:** brazo abierto.
- ❖ **BAS:** periodo experimental basal.
- ❖ **BC:** brazo cerrado.
- ❖ **BDZ:** Benzodiazepina.
- ❖ **Circuito de Papez:** estructura funcional cerebral compuesta por el hipocampo, el fórnix, los cuerpos mamilares, el giro del cíngulo, el giro para-hipocampal y la amígdala.
- ❖ **DE:** desviación estándar.
- ❖ **EBA:** entradas en el brazo abierto.
- ❖ **EEM:** error estándar de la media.
- ❖ **EKG:** electrocardiograma.
- ❖ **FC:** frecuencia Cardíaca.
- ❖ **FFT:** transformada rápida de Fourier.
- ❖ **FR:** frecuencia Respiratoria.
- ❖ **HRV:** del inglés *Heart Rate Variability*, sigla aceptada internacionalmente para referirse al análisis de variabilidad de la frecuencia cardíaca en el electrocardiograma.
- ❖ **Hz:** Hertzios, medida de frecuencia en unidad de segundos.
- ❖ **i.p.:** inyección por vía intraperitoneal.
- ❖ **LCE:** laberinto en cruz elevado
- ❖ **LTM:** del Inglés “Long term memory”, memoria a largo plazo.
- ❖ **LTV:** del Inglés “Log Term Variability”, análisis de variabilidad a largo plazo.
- ❖ **M15:** periodo experimental 15 minutos post-inyección.
- ❖ **M30:** periodo experimental 30 minutos post-inyección.
- ❖ **MA:** grupo experimental al que se administró Midazolam + Atenolol.
- ❖ **MDZ:** Midazolam.
- ❖ **MET:** Equivalente metabólico (unidad de medida).
- ❖ **NNx:** categoría del intervalo de tiempo en milisegundos existente entre una onda R del electrocardiograma y la siguiente.
- ❖ **OTT:** del Inglés “One Trial Tolerance”, tolerancia de la primera exposición.
- ❖ **PDO:** período.
- ❖ **PDE₄:** fosfodiesterasa tipo 4.
- ❖ **PI:** periodo experimental post-inyección.
- ❖ **PL:** periodo experimental post-laberinto.
- ❖ **pNNx:** proporción de intervalos de determinada categoría, ver NNx.
- ❖ **PPNL:** propanolol.

- ❖ **R-R**: intervalo de tiempo existente entre una onda R del electrocardiograma y la siguiente.
- ❖ **SA**: grupo experimental al que se administró Solución Salina + Atenolol.
- ❖ **SDANN**: Cálculo la desviación estándar del promedio de los todos intervalos R-R normales registrados durante cierto periodo de tiempo del EKG.
- ❖ **SDSD**: Desviación estándar de las diferencias entre intervalos R – R adyacentes
- ❖ **SES**: sesión experimental en el Laberinto en Cruz Elevado.
- ❖ **SM**: grupo experimental al que se administró Solución Salina + Midazolam.
- ❖ **SNA**: Sistema Nervioso Autónomo.
- ❖ **SNAp**: Sistema Nervioso Autónomo periférico.
- ❖ **SNC**: Sistema Nervioso Central.
- ❖ **SS**: solución salina normal (0,9% P/V). También hace referencia al grupo experimental al que solo se le administró dicha solución y que fue considerado como grupo de control.
- ❖ **STM**: del Inglés, “Short Term Memory”, memoria a corto plazo.
- ❖ **STV**: del Inglés, “Short Term Variability”, variabilidad a corto plazo.
- ❖ **TBA**: tiempo en el brazo abierto.
- ❖ **TTO**: tratamiento.
- ❖ **TW**: transformada de Wavelet.
- ❖ **VO2**: Consumo de oxígeno.

RESUMEN

TÍTULO* EFECTOS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO PERIFÉRICO SOBRE LA MEMORIA EMOCIONAL Y LA ANSIEDAD EVALUADAS EN EL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO.

AUTORES: DELGADO, H. y CONDE, C.**

PALABRAS CLAVE: MEMORIA EMOCIONAL, β -BLOQUEADOR, BENZODIAZEPINAS, ATENOLOL, ADRENALINA, LABERINTO EN CRUZ ELEVADO, ANALISIS DE VARIABILIDAD, RESPUESTAS AUTONOMICAS.

RESUMEN

Se presenta una serie de experimentos encaminados a investigar el efecto de diferentes intervenciones farmacológicas sobre el sistema nervioso autónomo y su efecto en la memoria emocional en la prueba del laberinto en cruz elevado (**LCE**). En total fueron sometidas 119 ratas Wistar macho a diferentes intervenciones farmacológicas intraperitoneales usando Midazolam (0,5 mg/Kg.), Adrenalina (0,05, 0,01, y 0,1 mg/Kg.), Atenolol (3 mg/Kg.) y vehículo (1 mL/Kg.) para la medición de sus variables fisiológicas y comportamiento en la prueba de LCE. **RESULTADOS:** La administración conjunta de un bloqueador beta-adrenérgico de acción periférica más una benzodiazepina en la primera sesión del LCE produjo un efecto amnésico en las ratas cuando fueron sometidas al LCE en sesiones posteriores, medido como un aumento de tiempo en el brazo abierto (Midazolam+Atenolol > vehículo+Midazolam o vehículo+Atenolol; Kruskal-Wallis, $p < 0.001$) durante la segunda sesión y las entradas al brazo abierto no tuvieron diferencias significativas entre sesiones para el grupo Midazolam+Atenolol ($p > 0.05$) mientras que en los demás grupos hubo menor frecuencia de estas; el tiempo en el brazo abierto durante la primera sesión fue menor en el grupo de control (Salina+Salina) que en los tres grupos restantes lo cual evidencia el efecto ansiolítico de las sustancias administradas (ANOVA 1 vía, $p < 0.001$). **CONCLUSIONES:** El bloqueo β -adrenérgico periférico ejercido por el Atenolol produjo un efecto amnésico en la segunda sesión del LCE aboliendo la presentación del fenómeno de One Trial Tolerance (**OTT**); existen trabajos previos que evidencian abolición del OTT al administrar conjuntamente Propranolol (bloqueador beta inespecífico) o Buspirona (antipsicótico atípico), pero estos fármacos a su vez inducen cambios en la citoarquitectura del encéfalo mientras que el Atenolol no cruza la barrera hematoencefálica. Además se presenta una serie de herramientas novedosas para el análisis electrocardiográfico y comportamental.

* TESIS

** FACULTAD DE SALUD. MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS. DIRECTOR: CARLOS ARTURO CONDE COTES.

SUMMARY

TITLE* THE EFFECTS OF PERIPHERAL BLOCKADE OF THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM OVER THE EMOTIONAL MEMORY AND ANXIETY IN THE ELEVATED PLUS-MAZE.

AUTHORS: DELGADO, H. and CONDE, C. **

KEYWORDS: EMOTIONAL MEMORY, β -BLOCKER, BENZODIAZEPINES, ATENOLOL, EPINEPHRIN, ELEVATED PLUS-MAZE, VARIABILITY ANALYSIS, AUTONOMIC RESPONSES.

ABSTRACT

There is presented a series of assays aimed to elucidate the effect of different pharmacological interventions over the autonomic nervous system and its effect in emotional memory using the elevated plus-maze (EPM) model. 119 male Wistar rats were injected intraperitoneally with different pharmacological compounds such as Midazolam (0,5 mg/Kg.), Epinephrine (0,05, 0,01, and 0,1 mg/Kg.), Atenolol (3 mg/Kg.) and vehicle (1 mL/Kg.) in order to measure their physiological and behavioral variables in the EPM test. **RESULTS:** the co-administration of peripheral β -blocker plus benzodiazepine in the EPM's first session produced an amnesic effect in rats underwent to EPM test when they were retested three days afterwards, this was observed as an increase in the open arms time span (Midazolam+Atenolol > Vehicle+Midazolam or Vehicle+Atenolol; Kruskal-Wallis, $p < 0.001$) during the second session, additionally, the open arms' entrances were not significantly different between sessions for the Midazolam+Atenolol ($p > 0.05$) group while the others had a minor frequency of these; the vehicle group had less open arm time span in the first session compared with the other groups giving a clear evidence of the anxiolytic effect of the drugs administered (One way ANOVA, $p < 0.001$). **CONCLUSIONS:** The peripheral blocking effect of Atenolol produced an amnesic effect in the second EPM's session abolishing the occurrence of the One Trial Tolerance (OTT) phenomenon; there are previous reports that evidence OTT's abolishing using Propanolol (unspecific β -blocker) or Buspirone (atypical antipsychotic), but those drugs induce changes in brain's cytoarchitecture while Atenolol does not cross the brain-blood barrier. Additionally, a set of innovative tools for electrocardiographic and behavioral assessment are presented.

* TESIS

** FACULTAD DE SALUD. MAESTRÍA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS. DIRECTOR: CARLOS ARTURO CONDE COTES

1. INTRODUCCIÓN

La memoria es un proceso de todos los seres vivos que les permite adquirir, retener y recuperar información de un determinado evento que sucede en un momento específico del tiempo y que puede utilizarse en un momento futuro para afrontar y solucionar las situaciones que se lleguen a presentar dentro del continuo que representa la línea del tiempo. Estos procesos de memoria son susceptibles de moldeamiento y remodelación dependiendo de factores asociados al evento que ocurre, entre ellos se encuentra el colorido emocional que puede tener un suceso y que hace parte de la experiencia propia de un ser vivo y de la forma como vive la situación que tiene lugar en su existencia. Dentro de los diferentes procesos de la memoria en lo referente a las emociones se ha evidenciado que estas son cofactores que pueden potenciar o interferir en el proceso intrínseco de la memoria, bien sea en reforzar la consolidación un registro de evento para ser evocado en el futuro o en interferir con los procesos para que dicho evento no trace huella en la memoria de un sujeto. Se ha planteado que las emociones tienen 2 orígenes, central y periférico, proponiéndose hipótesis para explicar cada teoría pero persiste la búsqueda de evidencias que permitan conocer cuales son los factores decisivos en los procesos de memoria asociada a emociones y si es posible modularlos de manera que puedan abrir puertas para ayudar a quienes padecen de trastornos mentales asociados a contenido emocional.

Este proyecto se concentra en la modulación del Sistema Nervioso Autónomo a través de manipulaciones farmacológicas específicas con la finalidad de evaluar el resultado comportamental en una prueba de ansiedad generalizada aplicada en animales, que posee validez facial y de constructo, además que detecta los efectos de fármacos de tipo ansiolítico y ansiogénico. Además se hace una exploración extensiva de otros parámetros asociados a las emociones y que pueden ser cuantificables para convertirlos en herramientas de análisis: las variables fisiológicas y el análisis de variabilidad del electrocardiograma.

Como resultado principal de este proyecto se encuentra al bloqueo del Sistema Nervioso Autónomo como una intervención efectiva en la abolición del fenómeno de *One Trial Tolerance*, el cual es un reflejo de la memoria asociada a emociones en donde ocurre pérdida del efecto ansiolítico de las benzodiazepinas después de haber sometido a los animales a la experiencia de un modelo de ansiedad generalizada. Los resultados de este proyecto cimentan nuevas propuestas dirigidas a la búsqueda de estrategias para modular la experiencia emocional y buscar nuevos horizontes en la solución de trastornos psiquiátricos asociados a emociones.

2. JUSTIFICACIÓN

La presente propuesta se enmarca en la línea de investigación sobre “memoria emocional asociada a trastornos de ansiedad” del grupo de investigación “Neurociencias y Comportamiento UIS-UPB” y es un refuerzo para el programa de maestría en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad Industrial de Santander.

El problema a abordar se relaciona con las contribuciones periféricas o centrales de las manifestaciones autonómicas involucradas en el procesamiento de la información con contenido emocional. En estos aspectos esta vigente una polémica conceptual acerca de cuáles son los mecanismos que contribuyen al reforzamiento mnemónico cuando en una persona o en un animal se potencia la consolidación mnemónica frente a informaciones con contenido emocional. Hay experimentos que apuntan en diferentes direcciones.

Es de amplia aceptación el que durante estados de activación emocional se presenten respuestas de predominio simpático que acompañan los comportamientos de los individuos. Una de las preguntas que surge se refiere a si estas manifestaciones autonómicas son consecuencia de la valoración emocional (mecanismos de origen central) o se constituyen en el refuerzo del proceso cognitivo, es decir, se asocian más a la causa de la potenciación mnemónica (origen periférico de la activación emocional). Contribuir a la aclaración de estos mecanismos, podría ayudar al cambio de estrategias terapéuticas vigentes en diferentes trastornos de ansiedad como el trastorno de estrés post-traumático o la ansiedad generalizada.

Quizás el modelo experimental animal de ansiedad y memoria emocional asociada a esta categoría de trastorno, es el relacionado con la exposición de roedores al laberinto en cruz elevado. En este modelo, breves exposiciones de una rata a dicho laberinto, induce procesos mnemónicos resistentes a fármacos benzodiazepínicos. Los mecanismos responsables por el impacto emocional aquí implicados, aún son motivo de estudio.

En este contexto, el presente proyecto se propone estudiar el efecto de la manipulación farmacológica del sistema nervioso simpático periférico sobre el comportamiento y las manifestaciones de tipo mnemónico y emocional en ratas expuestas al laberinto en cruz elevado. Para esto, se proponen 2 fases experimentales, la primera orientada a la descripción de los efectos autonómicos: frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, consumo de oxígeno y variabilidad RR del electrocardiograma; resultantes de la inyección intraperitoneal de la Adrenalina y del Atenolol; uno agonista y otro antagonista simpático, cuyos lugares de acción

son predominantemente periféricos. En esta fase se evaluarán diferentes dosis de cada fármaco anotado.

Una segunda fase esta orientada a la evaluación de los efectos comportamentales indicadores de memoria emocional asociados a la inyección de dichos fármacos en ratas expuestas en el laberinto en cruz elevado y se hará una correlación entre las manifestaciones fisiológicas autonómicas con las manifestaciones comportamentales.

Se espera que si las manifestaciones de activación simpática periférica son esenciales para el reforzamiento de la consolidación de la memoria emocional en este modelo, la Adrenalina potencie las manifestaciones mnemónicas mientras que el Atenolol las disminuya. Adicionalmente, se espera poder describir y correlacionar las manifestaciones autonómicas con las comportamentales.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Desde hace algunos años, ha cobrado nueva vigencia el debate existente acerca del origen central o periférico de las emociones, propuesto desde hace casi un siglo por James-Lange (teoría de origen periférico) y Cannon-Bard (teoría de origen central). En la literatura científica se han dado reportes con resultados divergentes y esto ha mantenido la discusión vigente dentro del ámbito científico. El esclarecimiento de estos fenómenos de la experiencia emocional ayudaría a diseñar nuevas estrategias de tratamiento de los trastornos de ansiedad asociados con el componente de memoria emocional y de ésta forma influir positivamente en la calidad de vida de las personas con éstas dolencias.

Hace aproximadamente un siglo, William James y Karl Lange propusieron que las aferencias viscerales influyen varios procesos comportamentales como la emoción, aprendizaje y memoria esto va en contraposición a lo propuesto por Walter Cannon y Phillip Bard quienes teorizaron que el origen de las expresiones emocionales se establecería en el sistema nervioso central donde ocurre la experiencia emocional y que estos fenómenos luego se traducirían en las respuestas autonómicas entre otras manifestaciones (Berntson *et al.* 2003).

Por otra parte, el modelo experimental más ampliamente utilizado como bioensayo para el estudio de la memoria emocional asociada a estados de ansiedad, es el implementado a través del laberinto en cruz elevado (LCE). Este modelo ha sido validado desde los puntos de vista comportamental, farmacológico y fisiológico. En este modelo, se detectan procesos mnemónicos de alta eficiencia en cuanto a que una breve exposición (5 minutos) de una rata a este laberinto, induce efectos de evitación de los brazos abiertos a largo plazo (comportamiento tipo ansioso) que resulta resistente a los fármacos ansiolíticos benzodiazepínicos; la ocurrencia de éste fenómeno se ha denominado “One Trial Tolerance” y se expondrá con mayor detalle más adelante. Se ha interpretado este fenómeno como un proceso de memoria emocional pero aún se desconocen los mecanismos neurobiológicos de tal reforzamiento.

En el presente proyecto se pretende contribuir a la generación de nuevos conocimientos sobre el tema pues al intervenir sobre el sistema nervioso autónomo periférico ejerciéndole un bloqueo β periférico, se atenuarían o eliminarían algunos de los componentes de la experiencia emocional y, siguiendo este orden de ideas podríamos validar o rechazar la hipótesis del origen periférico de las emociones a través de la evaluación del resultado de una intervención experimental teniendo como variables dependientes la presencia de respuestas de tipo ansioso en ratas y la ocurrencia de un fenómeno que evalúa memoria asociada a emociones conocido como “One Trial Tolerance”.

Partiendo del hecho que las emociones inducen o se asocian con manifestaciones fisiológicas y comportamentales ante una situación que experimenta un sujeto y que tienen componentes neurovegetativos y psicomotrices que moldean esta experiencia y crean una huella en la memoria del sujeto, se ha intentado explicar el origen de estos componentes a través de 2 teorías que van en caminos opuestos acerca de la génesis de las emociones y por lo tanto de la memoria emocional. Así, el planteamiento de Cannon y Bard predica que las emociones tienen su origen en el sistema nervioso central cuando se procesa un estímulo y que desde allí se generan todas las demás respuestas que se pueden observar en un estado emocional; por otra parte, el planteamiento de James y Lange propone que los estímulos generan respuestas en los diferentes órganos de recepción de un organismo y que estas señales al llegar al sistema nervioso central se conjugan en un proceso que termina generando un estado de activación emocional.

De esta forma, se pretende aportar a la discusión existente implementando en un modelo experimental animal que permita la manipulación farmacológica del sistema nervioso autónomo periférico (activación y bloqueo simpático) y la consecuente evaluación de los efectos sobre el comportamiento y la correlación fisiológico-comportamental. En ese sentido se formulan las siguientes preguntas básicas:

1. ¿El bloqueo o la potenciación de las aferencias simpáticas periféricas en ratas expuestas al laberinto en cruz elevado influirá en la memoria asociada a emociones?
2. ¿Se puede describir un estado de actividad del sistema nervioso autónomo de las ratas a través del análisis de variabilidad de sus manifestaciones y éste puede llegar a correlacionarse con el desempeño en una prueba de memoria emocional evidenciada por comportamientos en el laberinto en cruz elevado?

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

- Evaluar los efectos mnemónicos, los efectos de tipo ansiogénico y/o ansiolítico y algunos efectos fisiológicos de tipo autonómico, resultantes de la manipulación farmacológica sobre la actividad simpática periférica en ratas expuestas al laberinto en cruz elevado (LCE).

4.2. ESPECÍFICOS

- Evaluar en ratas expuestas al laberinto en cruz elevado, los efectos de tipo ansiolítico o ansiogénicos resultantes de la inyección intraperitoneal de un β - bloqueador periférico (Atenolol) y de un activador simpático periférico (Adrenalina).
- Evaluar en ratas expuestas al LCE, los efectos sobre la memoria emocional resultantes de la aplicación intraperitoneal del Atenolol y la Adrenalina.
- Correlacionar las manifestaciones comportamentales de ratas expuestas al LCE bajo los efectos del Atenolol y la Adrenalina, con el consumo de oxígeno, frecuencia cardíaca y respiratoria y algunos indicadores de la variabilidad RR del electrocardiograma.
- Describir la variabilidad RR de ratas expuestas al LCE (en el dominio del tiempo y de la frecuencia) bajo los efectos del Atenolol y la Adrenalina.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. MEMORIA

La memoria es un atributo característico a los seres vivos y se convierte en una capacidad para adquirir la información, retenerla y utilizarla cuando se hace necesario para responder a una situación del devenir; esta capacidad permite que la información adquirida y guardada previamente sea utilizada en la solución de nuevos problemas y situaciones, asimismo le permite a los individuos (se hace referencia en particular a los seres humanos) la capacidad para ubicarse dentro de un contexto del tiempo, generando los conceptos de pasado, presente y futuro al poder establecer una cronología de eventos en la experiencia de un individuo. La memoria se considera como un fenómeno complejo generado por procesos fisiológicos y psicológicos, que también están influenciados por factores asociados a inhibición y motivación (Baddeley 1999).

Los sistemas de memoria requieren de la información recibida por los órganos de percepción del ambiente externo y los de percepción del ambiente interno, esta información tendrá una calidad que dependerá de las características propias del estímulo y su acción sobre el órgano receptor además de la capacidad del sujeto de adquirir dicha información; como proceso subsiguiente está la interpretación de esta información y su integración dentro de los sistemas de memoria, aquí se hace susceptible a la influencia de la información previamente almacenada y resultando en una respuesta ante el nuevo estímulo que puede persistir o modificar la información previa dependiendo de la relación con la nueva información (Tulving 1995).

Entre los órganos que permiten al sujeto recolectar información del ambiente externo se encuentran los órganos de los sentidos, encontrándose una pléyade de variaciones en el desarrollo de los mismos moldeadas acorde al hábitat en que desarrollan sus actividades a lo largo de su vida, siendo por ejemplo más desarrollados en una especie que en otra acorde a las adaptaciones que haya sufrido una u otra especie. En el caso de diferencias entre organismos de una misma especie como puede ejemplificarse con el sentido del tacto en una persona que carece de visión, la persona ciega no tiene una mayor capacidad táctil comparada con un sujeto que no tiene esta condición pero el adiestramiento ha afinado la discriminación en sus receptores táctiles (Mountcastle 1980).

Los órganos que permiten recolectar información del medio ambiente interno son diversos, entre ellos están: quimiorreceptores, baroreceptores, osmoreceptores, etc. En el caso específico de los seres humanos la mayoría de las veces realizan su labor sin que los individuos tengan conciencia de su accionar pero en

determinadas situaciones pueden generar respuestas y disparar mecanismos que se traducen en sensaciones que sí se hacen evidentes para el individuo en un plano conciente, por ejemplo la sudoración y taquicardia refleja debido a un evento que produzca una descarga adrenérgica. De esta forma el sistema nervioso autónomo puede, incluso, preparar al organismo para reacciones conductuales y adaptaciones anticipadas en estados emocionales; estas reacciones viscerales suelen ser fundamentalmente de apoyo o de anticipación a las necesidades corporales (Koizumi y Brooks 1980).

5.1.1. Etapas de la memoria

La memoria ha sido estudiada desde diferentes perspectivas y se ha descrito diferentes etapas o subprocesos involucrados en la generación de un recuerdo, la expresión de una idea o una respuesta específica y reproducible ante un determinado estímulo. Las etapas del proceso de memoria pueden definirse de la siguiente forma en orden de ocurrencia:

5.1.1.1. Codificación

Son los procesos provocados por la percepción de estímulos correspondientes a la adquisición de la información; puede relacionársele con la creación de un código único que puede activarse incluso con la presentación de información fragmentada (Salasoo *et al.* 1985).

5.1.1.2. Consolidación

Puede definirse como la transferencia de memoria de corto plazo a largo plazo. Son los procesos relacionados con el almacenamiento de la información; estos se consideran como un punto crítico del sistema de memoria a corto (**STM**) y a largo plazo (**LTM**). Actualmente las explicaciones de la consolidación de la memoria incluyen los procesos moleculares, celulares y las interacciones de sistemas que trabajan con la finalidad de madurar y estabilizar la información en el cerebro (Debiec *et al.* 2002; Dudai 2004; McGaugh 2000; Wiltgen *et al.* 2004)

5.1.1.3. Evocación

Son los procesos relacionados con la búsqueda de información previamente almacenada y su reproducción en momentos posteriores al que se produjo el evento que por primera vez generó la información.

Probablemente el fraccionamiento de la memoria empezó con la propuesta de Hebb, hacia el año 1949, de discriminar en memoria a corto plazo donde se evidencia actividad eléctrica cerebral de forma temporal y memoria a largo plazo basado en el la ocurrencia de cambios neuroquímicos más permanentes. Él propuso incluso, un modelo conceptual de aprendizaje que aún es influyente en las teorías neurobiológicas (Baddeley 2001; Burgess *et al.* 2001).

Evidencias posteriores con el estudio de pacientes a quienes se les había extirpado el hipocampo debido a crisis epilépticas de difícil tratamiento aportaron al descubrimiento de que la memoria tiene múltiples sistemas en el encéfalo, estos pacientes tenían dificultades en ciertas tareas que implicaban el reconocimiento de personas, lugares y objetos; pero tenían perfecta memoria de las habilidades motoras que habían aprendido de modo no conciente; a partir de estos estudios hechos por Milner, Hebb y Penfield se tuvo la prueba experimental que permitió hacer la distinción posterior entre memoria implícita y explícita (Kandel *et al.* 1999a; Tulving 1995)

5.1.2. Clasificación de la memoria

Ha habido varios intentos por clasificar la memoria y se ha llegado a proponer diferentes niveles y clases, se ha tenido en cuenta de forma bastante notoria la intervención activa en los procesos de la memoria a partir del estudio de pacientes con lesiones cerebrales que les han acarreado disminuciones en su capacidad mnemónica y a partir de ello se ha ido subdividiendo un concepto que en principio fue considerado como algo monolítico (Baddeley 2001; Squire *et al.* 1993).

Partiendo el análisis neurobiológico y etológico del comportamiento puede considerarse dos clases de memoria: *filogenética*, presente en la mayoría de individuos de una misma especie y es resultado de un proceso genético y evolutivo, contiene información importante para la supervivencia de una especie en su medio ambiente; *ontogenética*, es otra clase de memoria que es adquirida por cada sujeto con las experiencias que ha vivido y no se transmite genéticamente a su progenie.

La memoria puede clasificarse acorde a la *cantidad de tiempo* en la que una información se halla disponible para ser evocada, además en función a la *capacidad* de la entrada de datos, se han determinado como *sistemas de memoria* conformados por:

1) *Memoria a corto plazo*: tiene una limitada capacidad de almacenamiento y una duración de segundos a minutos, después de transcurrir este tiempo la información desaparece completamente y “es olvidada” porque no hay persistencia del estímulo que la genera o porque se ha cambiado la tarea a ejecutar y hay una nueva entrada de datos. Un ejemplo de esto es la tarea de repetir un número telefónico recién dicho.

2) *Memoria a largo plazo*: tiene una capacidad *ilimitada* (hasta la fecha no se ha reportado algún evento que documente que se ha agotado su capacidad en un modelo científicamente sustentado) y una duración de horas hasta años, incluso todo el tiempo de vida de un sujeto. Un ejemplo de esta memoria es el aprendizaje de un idioma.

3) *Memoria operacional*: es una clase intermedia que comparte atributos de la memoria a corto y largo plazo, en ella se mantiene una información de cierta

complejidad solamente durante un tiempo en que es utilizada y luego es olvidada sin dejar rastro. Un ejemplo de esta memoria es organizar facturas por orden alfabético del proveedor en un archivador (Baddeley 1999; Tomaz y Costa 2001).

Dentro de la memoria a largo plazo se han zanjado diferentes *tipos* de la misma a partir de evidencias aportadas por la neuropsicología, basándose en el estudio de pacientes con lesiones cerebrales puntuales y también con los que han sufrido lesiones extensas.

5.1.2.1. Memoria explícita

También llamada *memoria declarativa* y tiene 2 sub-tipos bien definidos, *memoria semántica* y *memoria episódica*.

5.1.2.1.1. Memoria Semántica

Se refiere a la memoria que refleja nuestro conocimiento del mundo: conocer el significado de la palabra “casa”, saber cuántos metros hay en un kilómetro, saber cuál es el color de una guayaba madura. La memoria semántica contiene información que probablemente obtenemos a través de varios contextos y que utilizamos en varias situaciones diferentes (Baddeley 1999).

5.1.2.1.2. Memoria episódica

La memoria episódica puede definirse desde el punto de vista operacional como las experiencias propias de un individuo y su relación de espacio y tiempo con el medio ambiente donde ocurrieron, por ejemplo cuando conocimos un enorme y aromático cultivo de jazmines en las vacaciones del verano pasado; el principal atributo de ésta memoria es su especificidad: su capacidad de representar un evento particular y ubicarlo en el tiempo y el espacio, es decir, la capacidad de presentar una cronología en la autobiografía de un individuo.

Ésta definición es la más ampliamente aceptada y permitió la conceptualizar las separaciones aplicadas en el conocimiento del mundo, aunque Tulving desarrolló una interpretación mucho más específica (Baddeley 1999; Tulving 1995).

5.1.2.2. Memoria implícita

Comprende el aprendizaje de hábitos y habilidades a través de una lenta acumulación por medio de la repetición a lo largo de muchos ensayos, se manifiesta básicamente por un aumento del rendimiento en una tarea y normalmente no puede expresarse en palabras; se caracteriza por una respuesta, en general permanente, generada a partir de estímulos repetidos no reforzados. A partir de estos estímulos se pueden adquirir los hábitos y las habilidades necesarias para realizar alguna tarea específica; el condicionamiento también entra en esta categoría. Un ejemplo de memoria implícita son las habilidades perceptivas y motoras, así como el aprendizaje de ciertos tipos de procedimientos

y reglas tales como los de la gramática (Kandel, Schwartz, y Jessell 1999a; Tomaz y Costa 2001; Tulving 1995).

5.2. SUSTRATOS ANATÓMICOS RELACIONADOS CON LA MEMORIA

Actualmente se puede afirmar que la memoria no tiene un sitio o locus único pues diferentes estructuras encefálicas están relacionadas con la adquisición, almacenamiento y evocación de diversas informaciones adquiridas por aprendizaje. Veremos cada una de ellas.

5.2.1. Memoria a corto plazo

Tiene una fuerte dependencia del sistema límbico comprometido en los procesos de retención y consolidación de informaciones nuevas; hoy en día se hipotetiza también que la consolidación temporal de la información compromete estructuras como el hipocampo, la amígdala, la corteza entorrinal y el giro hipocampal, siendo transferida después para las áreas de asociación de la neocorteza parietal y temporal. Las vías que llegan y salen del hipocampo también son importantes para el estudio de la anatomía de la memoria.

Las *entradas* o *inputs* que llegan son constituidos por la vía fimbria–fórnix o por la vía perforante. Entre las *salidas* o *outputs* hay proyecciones importantes desde CA1 en el hipocampo que van hacia los córtices subiculares adyacentes. Existen también dos vías del hipocampo que son responsables de las interconexiones entre el propio sistema límbico: primera, el *circuito de Papez* (compuesto por el hipocampo, el fórnix, los cuerpos mamilares, el giro del cíngulo, el giro para-hipocampal y la amígdala); segunda, proyecciones de áreas corticales asociativas por medio del giro del cíngulo y corteza entorrinal que van al hipocampo el cual a su vez se proyecta a la corteza prefrontal por medio del núcleo septal y del núcleo talámico medial creando así un circuito de reverberación de informaciones que se activa durante algún tiempo.

5.2.2. Memoria operacional

Comprende un sistema de control de atención (*ejecutivo central*) auxiliado por 2 sistemas de soporte (la *agenda visuo-espacial* y el *asa fonológica*) que ayudan al almacenamiento temporal y la manipulación de las informaciones. El ejecutivo central tiene una capacidad limitada en función de seleccionar estrategias y planes teniendo su actividad en relación con el lóbulo frontal el cual supervisa las informaciones; el cerebelo también está comprometido en el procesamiento de la memoria operacional actuando en la catalogación y manutención de las secuencias de eventos que es algo necesario en situaciones que requieren el ordenamiento temporal de informaciones.

El sistema de agenda visuo-espacial tiene un componente visual relacionado con la región occipital y un componente espacial relacionado con las regiones del lóbulo parietal. En cuanto al asa fonológica, la articulación subvocal ayuda a la persistencia de la información y cuando se realizan lesiones en los giros supramarginal y angular del hemisferio izquierdo genera trastornos de la función verbal auditiva de corta duración. Estas estructuras y procesos del asa fonológica parecen jugar un papel crítico en el aprendizaje del lenguaje y de la formación de memoria a largo plazo (Baddeley 1995; Damasio *et al.* 1996; Gathercole *et al.* 2007; Gathercole y Baddeley 1990).

5.2.3. Memoria a largo plazo

5.2.3.1. Memoria Explícita

Depende de estructuras del lóbulo temporal medial (incluyendo el hipocampo, corteza entorrinal y parahipocampal) y el diencefalo; además, el septo y los haces de fibras que llegan del prosencéfalo basal al hipocampo también parecen tener funciones importantes en este tipo de memoria; no obstante, a pesar que la memoria episódica y la semántica dependen de estructuras del lóbulo temporal medial es importante destacar la relación de estas estructuras con otras. Por ejemplo, los pacientes con disfunción de los lóbulos frontales tienen más dificultades para la memoria episódica que para la semántica y las lesiones del lóbulo parietal izquierdo generan alteraciones en la memoria semántica.(Weiskrantz 1987)

5.2.3.1.1. El Hipocampo

El hipocampo es una estructura que merece una mención especial y ha sido extensamente estudiado en ratas, monos y humanos, con diferentes disposiciones anatómicas propias de cada especie, encontrándosele como una estructura fundamental para los procesos involucrados en memoria de tipo “declarativa” o *explícita*; cumple una función de aparato integrador de distintas estructuras y circuitos distribuidos en el cerebro y la corteza cerebral, que al juntarlos representan un todo de la memoria; se ha evidenciado que el hipocampo no desempeña un papel crítico en los procesos de memoria *implícita* o “no-declarativa” pero por ello no dejan de ser sumamente interesantes como son los procesos que derivan en hábitos, habilidades, condicionamiento simple y el fenómeno de “*priming*” (imprimación). (Squire 1992).

5.2.3.2. Memoria Implícita

El aprendizaje de habilidades motoras depende de aferencias corticales de áreas sensoriales de asociación para el cuerpo estriado y para los núcleos de la base. El núcleo caudado y el putamen reciben proyecciones corticales y envían unas para

el *globus pallidus* y otras estructuras del sistema extrapiramidal, constituyendo un circuito entre el estímulo y la respuesta. El condicionamiento de las respuestas de la musculatura esquelética depende del cerebelo y el condicionamiento de las respuestas emocionales depende de la amígdala. El sitio anatómico del *priming* se halla probablemente en la neocorteza según hallazgos de estudios usando tomografía con emisión de positrones (Squire *et al.* 1992).

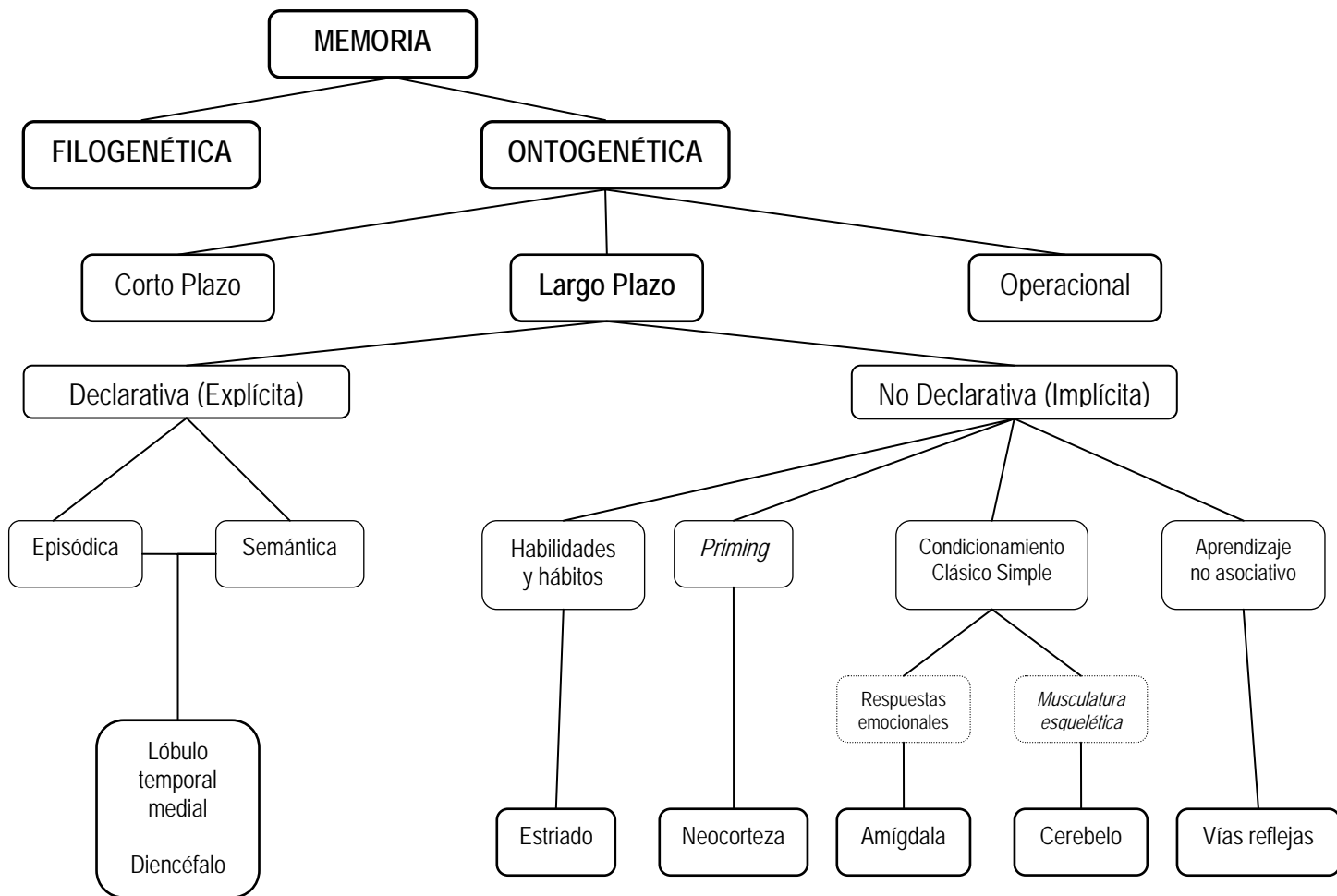


Figura 1. Taxonomía de la memoria y estructuras cerebrales asociadas (adaptado de Squire y Knowlton 1995; Tomaz y Costa 2001)

5.3. EMOCIÓN

Hasta la fecha no existe consenso en la definición teórica de las emociones algo que determine de forma sintética un fenómeno emocional o que permite relacionar estos fenómenos con unos sustratos neurales (LeDoux 1995).

La palabra *emoción* puede significar varias cosas; de forma muy general, la mayoría de veces se refiere a *sentimientos* positivos o negativos generados por situaciones concretas. Las emociones consisten en conjuntos o patrones de respuestas fisiológicas y conductas típicas de una especie, son respuestas psicomotoras y neurovegetativas que ocurren como respuesta ante un determinado estímulo, interno o externo y le permiten responder de forma adaptativa porque la función primaria de las emociones es la adaptación de la conducta a las situaciones que terminan siendo relevantes para un individuo (Aguado 2002; Carlson *et al.* 2005b)

Una respuesta emocional está constituida por tres tipos de componentes: comportamentales, autonómicos y hormonales. El **componente comportamental** se evidencia en los movimientos musculares apropiados para responder a la situación que los provoca; por ej., el repertorio de movimientos y posturas que adopta un animal cuando se le presenta un estímulo aversivo. El **componente autonómico** se evidencia en las respuestas neurovegetativas que facilitan las conductas y aportan una rápida movilización de energía para ejecutar los movimientos acorde a la situación; por ej., el aumento del flujo sanguíneo hacia los músculos y aumento de la frecuencia cardíaca. El **componente hormonal** se observa en las respuestas fisiológicas a través de sustancias que refuerzan las respuestas neurovegetativas, por ejemplo, la secreción aumentada de corticosterona, Adrenalina y Noradrenalina en la médula suprarrenal que facilitan el aumento metabólico de los músculos. (Carlson *et al.* 2005b)

Todos estos fenómenos fisiológicos se presentan como respuesta a estímulos y configuran un estado de activación que facilita la experiencia emocional. En el ser humano, las emociones básicas pueden acompañarse de expresiones faciales, movimientos de aproximación o evasión, fuga, lucha o de comportamientos más complejos que pueden ser interpretados como evaluación del riesgo, agresión, protección, etc. (Blanchard y Blanchard 1988; Cruz *et al.* 1994; de Gelder 2006)

Las interacciones entre las emociones y las respuestas comportamentales terminan siendo de tipo adaptativo y hacen parte de los procesos evolutivos, de esta manera un individuo se adapta a sus experiencias y gracias a ello puede generar procesos de memoria asociados a emoción que le provocan reacciones que pueden llegar a evitar situaciones de riesgo y así no comprometer la permanencia de la especie (por ejemplo, la aproximación de un predador, evitar las alturas, etc.). Estas respuestas son determinadas por procesos emocionales y las diferentes respuestas son determinadas por las situaciones a que se ve expuesto un individuo. (Damasio 1996; Hyman 1998; Svenson *et al.* 2007).

5.3.1. Memoria Emocional

Se refiere a los procesos de adquisición, consolidación y evocación de los *estados emocionales* asociados a la experiencia de un individuo y pueden evaluarse en los animales y en los seres humanos a través de aproximaciones experimentales específicas que representan estos estados emocionales al mismo tiempo que pueden evaluarse las respuestas comportamentales y fisiológicas del individuo. Las lesiones en el complejo amigdalino han generado diversas evidencias y todas fuertemente relacionadas con la emoción: pérdida de los comportamientos de agresión, reducción notoria de las respuestas emocionales frente a estímulos nocivos, disminución del miedo a los estímulos novedosos y del aprendizaje basado en el miedo. Por otra parte, la estimulación de este complejo estructural puede evocar experiencias emocionales acompañadas de respuestas autonómicas (Conde *et al.* 2001a).

Los estudios realizados en animales y en humanos han evidenciado que la amígdala juega un papel crítico en la adquisición y retención de las experiencias emocionales. Se han utilizado diferentes abordajes en el estudio de los núcleos del complejo amigdalino que pueden resumirse en dos grandes grupos: primero, lesiones selectivas de núcleos específicos; segundo, administración de fármacos antes y después de protocolos de entrenamiento o exposición a una prueba (McGaugh *et al.* 1996).

Los estudios de memoria emocional realizados en animales han usado extensivamente a los roedores y en menor proporción a otros mamíferos aplicándoles la prueba de evitación inhibitoria o paradigmas de condicionamiento al miedo.

En la prueba de evitación inhibitoria se ha observado que las lesiones de la amígdala impiden la adquisición y retención de respuestas aversivas y también aplacan las respuestas innatas de miedo. Además, las lesiones de los núcleos central y lateral también pueden bloquear los efectos amnésicos del Diazepam sobre la retención de informaciones adquiridas en la prueba, apuntando a que la amígdala puede estar comprometida en la mediación de influencias moduladoras de los sistemas de memoria. Ya se ha evidenciado que la amígdala tiene funciones relacionadas con la ponderación de la severidad de los estímulos aversivos (Tomaz *et al.* 1991; Tomaz *et al.* 1992; Tomaz *et al.* 1993).

En las pruebas de condicionamiento al miedo (“miedo condicionado”) se ha evidenciado que la amígdala hace parte de circuitos esenciales para la adquisición y almacenamiento de memorias condicionadas así como para la expresión de respuestas de miedo. Uno de los circuitos más relevantes está conformado por el *núcleo lateral*, que recibe información (“*input*”) de los sistemas sensoriales provenientes de la corteza y el tálamo, y el *núcleo central*, que tiene (“*output*”)

referencias al hipotálamo paraventricular y lateral; este circuito interviene en la expresión de respuestas de miedo como el congelamiento motor (“freezing”) y las respuestas autonómicas y endocrinas (Phelps y LeDoux 2005).

Se han evidenciado variadas influencias de sistemas neuromoduladores en los procesos de memoria mediada por el complejo amigdalino, entre ellos se hallan los sistemas adrenérgico, noradrenérgico, colinérgico, peptidérgico, opioide y GABAérgico. Además, en estudios hechos en animales y en humanos se han notado indicios interesantes acerca de la interacción de las hormonas de estrés y la activación de la amígdala con efectos en la consolidación de la memoria. Estudios en animales y humanos han evidenciado que la sinergia entre los compuestos β -adrenérgicos y la activación de la amígdala aumentan la consolidación de la memoria (Gold *et al.* 1984; Sternberg *et al.* 1982); en el caso de los β -bloqueadores se ha evidenciado que producen una disminución del desempeño en las pruebas de memoria, no obstante, hay que tener en cuenta que los experimentos se han enfocado en fármacos que cruzan la barrera hematoencefálica y esto ha dificultado la clara delimitación del efecto final (Conde *et al.* 2001a; McGaugh *et al.* 1996; McGaugh y Cahill 1997; van Stegeren *et al.* 1998).

En los seres humanos se han hecho estudios en laboratorio y observaciones de campo dirigidas a los sistemas de memoria emocional y se han utilizado diferentes instrumentos como las historias neutras e impactantes en los que se ha visto que el contenido emocional ejerce un papel facilitador en los procesos de memoria. En este sentido se ha encontrado que hay relación entre el alertamiento emocional referido por los sujetos y la retención de la información porque se ha hallado un mejor desempeño en las pruebas de recuerdo libre varios días después en sujetos a quienes se les presentó una historia de *contenido emocional* frente a quienes se les presentó una historia *neutra*, apuntando a un incremento en la memoria declarativa a largo plazo debido al contenido emocional de la historia (Botelho *et al.* 2004; Cahill y McGaugh 1998; Frank y Tomaz 2000).

5.4. LABERINTO EN CRUZ ELEVADO

Éste es un modelo experimental para el estudio de ansiedad generalizada en el que se usan roedores como sujetos experimentales, en un principio se usaron las ratas pero después se han ido usando otros: ratones, *gerbils* (también llamados “ratas del desierto”) y cerdos de guinea (File *et al.* 1988; Rex *et al.* 1993; Rex y Fink 1998; Varty *et al.* 2002). El LCE ha sido probado desde diversas aproximaciones: farmacológica, fisiológica y comportamental. Su uso se ha popularizado y ya se tienen experiencias con el modelo que datan de 20 años atrás (Carobrez y Bertoglio 2005). La evitación sin ambigüedades de los brazos abiertos que muestran los roedores es, por supuesto, totalmente consistente con

el postulado que establece que estas zonas evocan una mayor reacción de *miedo* que los brazos cerrados y de esta forma el modelo adquiere *validez facial* y *validez de constructo* (Rodgers y Dalvi 1997).

La **validación comportamental** se evidenció al someter a la prueba a roedores sin intervención alguna, los cuales presentaron un comportamiento sistemático con gran tendencia a permanecer más tiempo en los brazos cerrados (**BC**) que en los abiertos (**BA**) así como a realizar menos entradas a los BA que a los BC. La **validación farmacológica** se ha evidenció por medio de la aplicación de fármacos ansiolíticos clínicamente efectivos (p. ej., diazepam) a los animales sometidos a la prueba aumenta el número y el tiempo de entradas al BA comparado con los que se les administró placebo y ocurrió viceversa al administrar un fármaco ansiogénico; la **validación fisiológica** se evidenció al medir la concentración de corticosterona plasmática, una hormona que se libera en estados de ansiedad, la cual estaba aumentada en los animales confinados al BA frente a la concentración de los animales confinados al BC (File *et al.* 1994; Pellow *et al.* 1985)

Los primeros resultados publicados sobre el comportamiento de roedores en laberintos datan de más de 50 años atrás, Montgomery publicó un trabajo hecho con laberintos en “Y” elevados y encontró que las ratas mostraban un comportamiento tendiente a explorar y permanecer más tiempo en los *BC* que en *BA* y atribuyó esta tendencia de preferir los *BC* al hecho que los brazos abiertos podían estar induciendo elevados estímulos de ansiedad y “miedo” a los animales. A partir de eso se asumió que el estado innato e incondicionado de miedo a los espacios abiertos que se halla en las ratas les produce un estado de ansiedad fácilmente reconocible y cuantificable dentro del paradigma de la prueba (Blanchard y Blanchard 1988; File 1993; Griebel *et al.* 1993; Montgomery y Monkman 1955).

Su fundamento se relaciona con el miedo incondicionado y con patrones de comportamiento espontáneo del animal, partiendo del constructo que hipotetiza que los roedores tienden a evitar los lugares abiertos y prefieren los lugares cerrados quizás por considerarlos como “sitios seguros” o donde existe poca probabilidad de ser atacado por algún depredador, estos hallazgos tienen una fuerte validez etológica y ya han sido abordados por otros investigadores (Blanchard y Blanchard 1988; Rodgers y Dalvi 1997).

Las ventajas de este modelo estático de ansiedad generalizada son: **primera**, bajo costo de instalación y mantenimiento; **segunda**, las pruebas son sencillas y rápidas de ejecutar; **tercera**, se basa en un comportamiento espontáneo y no requiere entrenamientos prolongados, ni privación de agua o comida, tampoco exige el uso de estímulos dolorosos; **cuarta**, detecta bidireccionalmente los efectos agudos de fármacos ansiolíticos y ansiogénicos, aunque algunos también los mencionan como panicolíticos y panicogénicos (Rodgers *et al.* 1997) dentro del

paradigma construido sobre el laberinto en cruz elevado. Dado éste perfil, el LCE ofrece bastantes ventajas en el estudio rutinario de fármacos y el estudio de mecanismos de ansiedad (Pellow et al. 1985; Rodgers y Dalvi 1997).

A partir de estos hallazgos consistentes se han construido diferentes experimentos donde se asume que la exposición a un laberinto con espacios (brazos) abiertos dispara un mecanismo que genera ansiedad en las ratas y que se puede atenuar este fenómeno al usar fármacos con efecto ansiolítico administrados antes de realizar la exposición al laberinto (Blanchard y Blanchard 1988; Griebel et al. 1993; Treit *et al.* 1993).

Hasta la fecha se han hecho experimentos con el LCE que implican diversos tipos de manipulaciones que incluyen: estrés sicosocial, benzodiazepinas, ligandos de receptores GABA, neuroesteroides, ligandos de receptores 5-HT, fármacos ansiolíticos y ansiogénicos (algunos autores los catalogan como panicolíticos y panicogénicos) entre otros (Rodgers *et al.* 1997).

Hay reportes de otras sustancias como el Rolipram que es un inhibidor específico de la fosfodiesterasa tipo 4 (**PDE₄**) del AMP cíclico (**AMPC**) presente en el cerebro, y que muestra efecto de tipo ansiolítico en ratas sometidas a LCE por primera vez y sin manipulación previa, se halló aumento en las entradas al BA y tiempo transcurrido en el BA en el grupo tratado con rolipram y que estos resultados eran similares a los obtenidos al suministrarle Diazepam a 3mg/kg al otro grupo de ratas (Silvestre *et al.* 1999a); no obstante, hubo disminución del comportamiento exploratorio comparado con el grupo de DZP pero esto fue independiente de los hallazgos respecto al BA y al someterles a una prueba de campo abierto, estos hallazgos quizás se deban a la interferencia en el sistema acetilcolinérgico debida a los efectos del fármaco (Silvestre *et al.* 1999b) .

Se han venido evaluando otros factores que inciden en el comportamiento de las ratas sometidas a la prueba del LCE y se han encontrado hallazgos interesantes relacionados con la población que se tiene en las jaulas pues los animales almacenados a baja y alta densidad poblacional (menos de 4 y más de 16 individuos por jaula) tienen una disminución en las EBA relativas y en el TBA relativo que en animales almacenados en grupos de 4 a 12 por jaula (Botelho *et al.* 2007) ; a partir de estos hallazgos se mantuvo una población usual de 6 animales por jaula para todos los experimentos de ésta tesis.

También se ha postulado al conflicto generado por las características contrastantes de los BA y los BC como el factor que genera el comportamiento de la rata dentro del LCE mas que los atributos físicos aversivos de los BA y este hallazgo confirmó un modelo computadorizado diseñado para predecir tal comportamiento en donde se hicieron experimentos con los 4 brazos cerrados, los 4 brazos abiertos y de forma convencional (2 BC y 2 BA) hallando que en los modelos con 4 BC y 4 BA no hubo diferencias en la conducta exploratoria en

relación a permanencia en extremos y parte media, mientras que el modelo convencional si hubo preferencia por los 2 BC (Salum *et al.* 2003).

Así mismo se han encontrado otros factores que determinan el comportamiento de las ratas durante la prueba de LCE y estos son dependientes de la información que recibe el animal desde su entorno a través de las vibrisas, por medio de una función sensitiva llamada tigmotaxia que es parte del repertorio defensivo natural de las ratas y que les genera tendencia a permanecer cerca de las superficies verticales (Treit y Fundytus 1988); así mismo, la tigmotaxia confiere una extraordinaria capacidad para que la rata logre diferenciar entre uno y otro tipo de superficie que entra en contacto con sus vibrisas (Albarracin *et al.* 2006). No obstante, éste no es el único factor que puede estar relacionado con el origen de la ansiedad asociada al LCE y se ha evidenciado que la luz puede ejercer un papel importante porque en ratas a las que se les removieron las vibrisas y fueron sometidas al LCE con baja iluminación, estuvieron más tiempo dentro de los brazos abiertos que las ratas con sus vibrisas intactas pero bajo condiciones de alta luminosidad (Cardenas *et al.* 2001) e incluso cuando se pusieron paredes transparentes que cerraran los brazos abiertos a diferentes alturas (1, 5, 10, 20 y 40 cm) se encontró que no había diferencias entre ellas y que las ratas seguían mostrando menores entradas y tiempos en los brazos “abiertos” (rodeados por paredes transparentes) comparados con los animales que se asignaron al mismo tipo de prueba pero con las paredes forradas con papel blanco y papel negro sugiriendo que la vía visual dispara mecanismos de aversión a los espacios abiertos. Adicionalmente, la exploración del LCE en condiciones de muy baja luminosidad (9 Lux en el centro del laberinto) no permite evidenciar diferencias significativas ni en los tiempos ni en el número de entradas a los brazos abiertos comparado con los brazos cerrados, e incluso no fue posible evidenciar el efecto de tipo ansiolítico del Diazepam (Conde *et al.* 2001b; Martinez *et al.* 2002).

Todo esto sugiere que los mecanismos por los que actúa la ansiedad dentro del modelo pueden ser diversos y que justifica la exploración de nuevas alternativas farmacológicas para ser validadas dentro del modelo con posibilidad de uso clínico futuro, así mismo, justifica la búsqueda de alternativas terapéuticas que supriman el fenómeno de “One Trial Tolerance” que se presenta en el LCE cuando se expone por más de una vez a las ratas en el laberinto y que se relaciona con un estado de ansiedad interpretado por algunos como de tipo fóbica (File 1993).

5.4.1. Fenómeno de “One Trial Tolerance”

Este fenómeno se relaciona con el comportamiento de las ratas en el LCE cuando han sido previamente expuestas una vez al mismo, es decir, es dependiente de la experiencia previa de la rata en tal laberinto. Consiste en que durante una re-exposición de los animales al LCE (independiente de si han recibido o no una benzodiazepina antes de la primera exposición) los animales no presentan

manifestaciones comportamentales de tipo ansiolítico frente a fármacos que en la primera exposición sí producían tales manifestaciones. Por su semejanza con la llamada tolerancia farmacológica, este fenómeno se ha llamado “One trial tolerance” (OTT) (File *et al.* 1990; File *et al.* 1993; File y Zangrossi, Jr. 1993).

Se ha tratado de esclarecer y controlar las diferentes variables que pueden afectar el desempeño de los animales y la respuesta ansiolítica del fármaco en la *re-exposición* al LCE, algunos de estos posibles factores a los que han apuntado diferentes estudios realizados con dicho propósito son: tiempo de exposición del animal al laberinto, tiempo entre sesiones, la manipulación antes de exponerlo por primera vez al LCE, la naturaleza del estímulo aversivo que induce el OTT, tipo y concentración del fármaco utilizado, manipulación e inyección de tipo crónico (Bertoglio y Carobrez 2002a; Bertoglio y Carobrez 2002b; Bertoglio y Carobrez 2002c; Cruz-Morales *et al.* 2002; Escarabajal *et al.* 2003; File, Mabbutt, y Hitchcott 1990).

El OTT también ha sido descrito en otros modelos animales de ansiedad (Hascoet *et al.* 1997; Holmes *et al.* 2001; McGregor y Dielenberg 1999; Petit-Demouliere *et al.* 2007; Petit-Demouliere y Bourin 2007) y parece estar fuertemente relacionado con la exposición o *experiencia* previa que altera la eficacia del fármaco ansiolítico, en virtud de estos hallazgos se han señalado a los factores que intervendrían en la unión de los fármacos con los complejos del receptor GABA_(A) como los principales implicados en el desarrollo del OTT (Bertoglio y Carobrez 2002a).

Las BDZ además de ser fármacos con efecto ansiolítico también producen algún grado de amnesia por su efecto sobre los receptores ubicados en la región basolateral del complejo amigdaloides y esto puede estar creando alguna interferencia con la función que pondera la intensidad (o *severidad*) de los estímulos aversivos que experimenta un sujeto (Bueno *et al.* 2005; Conde *et al.* 2001a; Moreira *et al.* 2007; Pesold y Treit 1994; Salinas y McGaugh 1996; Silva y Tomaz 1995; Tomaz *et al.* 1993; Tomaz *et al.* 2003).

La presencia de esta pérdida del efecto ansiolítico, conocida como OTT, ha sido postulada como un proceso emocional cuyas manifestaciones podrían considerarse similares a un fenómeno de *taquifilaxia* y se manifiesta dentro del lapso de 1 a 2 semanas posteriores a la primera exposición al LCE o también ha sido postulado como un proceso mnemónico persistente por periodos prolongados entre exposiciones al LCE y que tiene un fuerte efecto en el comportamiento del animal (File, Mabbutt, y Hitchcott 1990; Pellow y File 1986; Treit *et al.* 1993).

Los trastornos de ansiedad y dentro de ellos, el estrés post-traumático, afectan un porcentaje notable de la población colombiana, en el caso del segundo, las cifras más recientes según el Ministerio de Protección Social de Colombia muestran una alta prevalencia en nuestro medio: 2.5% en mujeres y 0.8% en hombres de la

población general. Hasta ahora el abordaje terapéutico de estos trastornos incluye además de las medidas psicoterapéuticas el uso de fármacos entre ellos los bloqueadores β adrenérgicos, con resultados variables y en ocasiones con efectos secundarios que no estimulan su cumplimiento por parte de los pacientes. Dentro de los criterios diagnósticos clínicos y los criterios sugeridos para los modelos animales de estrés post-traumático, se contemplan: Breves exposiciones al estímulo estresor deben estar asociados al comienzo del cuadro comportamental, los efectos de la breve exposición deben ser sostenidos a muy largo plazo, las reexposiciones al estímulo no producen insensibilización ni habituación e inclusive llegan a empeorar el cuadro y finalmente, el estado se asocia a reactividades emocionales asociadas a factores genéticos. Varios de estos criterios parecen cumplirse en el modelo de exposición y re-exposición de las ratas en el LCE (Yehuda y Antelman 1993).

5.5. ANSIEDAD, MEMORIA y SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO

Hace aproximadamente un siglo, William James y Karl Lange propusieron que las aferencias viscerales influyen varios procesos comportamentales como la emoción, aprendizaje y memoria (Kandel *et al.* 1999b) ; esto va en contraposición a lo propuesto por Walter Cannon y Phillip Bard quienes teorizaron que el origen de las expresiones emocionales se establecería en el sistema nervioso central donde ocurre la experiencia emocional y que estos fenómenos luego se traducirían en las respuestas autonómicas entre otras manifestaciones (Berntson *et al.* 2003; Kandel, Schwartz, y Jessell 1999b).

Hoy es ampliamente aceptado, que durante estados de activación emocional, no sólo se pueden identificar las manifestaciones subjetivas de quien está sometido a tal estado, sino que existen manifestaciones fisiológicas tangibles asociadas al comportamiento del individuo, sea humano o animal (repertorios de aproximación o evitación), manifestaciones fisiológicas autonómicas y glandulares (modificaciones de la frecuencia cardiaca, respiratoria, niveles de hormonas suprarrenales etc.) y respuestas específicas a fármacos (Laborit 1975; LeDoux 1995; Tornatzky y Miczek 1994).

La ansiedad es un estado emocional subjetivo desencadenado por un estímulo potencialmente peligroso o que genera incertidumbre. Cuando un individuo se enfrenta a una situación desagradable o a una amenaza a su integridad física, bienestar o su supervivencia, se producen alteraciones en su comportamiento como la fuga o evitación, también se producen posturas y vocalizaciones que pueden alertar a otros individuos sobre la situación peligrosa; estas respuestas comportamentales se acompañan de cambios fisiológicos del sistema nervioso autónomo, tales como aumento de presión arterial y de la frecuencia cardiaca y respiratoria entre otros. Y también se puede acompañar de alteraciones hormonales por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales que produce

respuestas como aumento de niveles de hormona adrenocorticotrópica, cortisol y aumento de noradrenalina en la sangre (de Kloet *et al.* 2006; de Kloet *et al.* 2005; Labar y Cabeza 2006).

En algunas patologías psiquiátricas como las *crisis de angustia* que están catalogadas en el DSM-IV-TR dentro de los *trastornos de ansiedad* aunque no se les considera como un diagnóstico específico sino como manifestaciones de otros trastornos como el *Trastorno de ansiedad generalizada (F41.1)* o el *Trastorno de ansiedad con agorafobia (F40.01)*, se hallan descritos síntomas de activación (de predominio simpático) del sistema autónomo que acompañan la aparición temporal y aislada de miedo, estos síntomas autonómicos deben aparecer súbitamente y alcanzan su máxima expresión en los primeros 10 minutos, entre ellos están: palpitaciones y elevación de la frecuencia cardíaca, sudoración, náuseas, inestabilidad, parestesias, escalofríos, entre otros. Se ha evidenciado que un cierto grado de ansiedad puede motivar un buen desempeño en tareas cognitivas, pero una ansiedad exagerada puede ser deletérea y termina perturbando notoriamente el desempeño del sujeto, en este último caso podríamos hablar de una *ansiedad patológica* (American Psychiatric Association 2000; Kalueff 2007).

En humanos, se han dado reportes que señalan que el bloqueo β adrenérgico desmejora la memoria asociada a experiencias emocionales (Cahill *et al.* 1994) pero otros investigadores usando bloqueadores β no selectivos hallaron que no hubo diferencias significativas respecto al placebo en una prueba de recuerdo libre de memoria asociada a contenido emocional (O'Carroll *et al.* 1999a) ; sin embargo, el mismo grupo investigador halló que al brindar un medicamento estimulante noradrenérgico se aumentaba el recuerdo y el reconocimiento de material emocional (O'Carroll *et al.* 1999b). Hasta el momento persiste la controversia sobre el tema y es nuestro propósito contribuir con resultados que ayuden a esclarecer los mecanismos básicos asociados.

Hay extensa evidencia que sugiere que el complejo amigdaloides tiene un papel crítico en los procesos de memoria basada en emociones (Davis 1994; LeDoux 1993). En la amígdala cerebral se ha encontrado activación noradrenérgica como resultado de “adecuación” visceral para funciones de memoria (Power *et al.* 2002; Ston-Jones *et al.* 1991) y esta se ha abolido farmacológicamente (Clayton y Williams 2000) o al hacer vagotomías bloqueando la potenciación de la memoria inducida por epinefrina o al remedar sus efectos estimulando el nervio vago (Clark *et al.* 1998). Otros autores han propuesto que la amígdala cerebral ejerce una función en la orquestación de las propiedades emocionales del estímulo (Tomaz, Frank, y Conde 2003) y que las hormonas relacionadas con el estrés modulan la consolidación de la memoria de manera que al lesionar la amígdala, estos efectos mnemónicos se bloquean (McGaugh 2000). A partir de esto se podría deducir que las aferencias autonómicas desde el sistema nervioso periférico pueden estar jugando un papel importante en la memoria asociada a emociones al brindar unos

atributos que permiten discriminar los estímulos que se reciben acorde a diferentes “grados” de emoción que pueden generar en un individuo.

Experimentos con ratas sometidas al laberinto en cruz elevado (LCE) y tratadas con benzodiazepinas han reportado un fenómeno llamado “One Trial Tolerance” (OTT) (Cruz-Morales, Santos, y Brandao 2002; File y Zangrossi, Jr. 1993; Frussa-Filho y Ribeiro 2002) el cual consiste en una eliminación del efecto ansiolítico de las benzodiazepinas después de la primera exposición al LCE y ha sido interpretado como una memoria emocional asociada al tipo de reforzamiento presentado durante la sesión de aprendizaje. Hasta ahora no hay explicación contundente de éste hallazgo (Carvalho *et al.* 2005; File y Zangrossi, Jr. 1993; Frussa-Filho y Ribeiro 2002). Este fenómeno, probablemente esté relacionado con el impacto emocional de la primera exposición mediado por la activación simpática. Si esto es así, se puede postular la hipótesis que propone bloquear las aferencias autonómicas mientras se somete a un animal a un modelo de ansiedad generalizada como el LCE, y esto puede atenuar o abolir la ocurrencia de un efecto tipo ansiogénico y en consecuencia el impacto mnemónico de la experiencia.

La Adrenalina es una molécula polar, cruza muy poco la barrera hematoencefálica y la inyección de ésta en ratas puede actuar, por sí sola, como un estímulo condicionado aversivo que genera respuestas de “congelamiento” por estrés (Morris *et al.* 2005). De esta forma se esperaría un aumento de las respuestas de evitación de un ambiente potencialmente aversivo en las ratas inyectadas con Adrenalina, e incluiría una mejor consolidación de la memoria emocional. Por el contrario, en las ratas inyectadas con Propanolol (PPNL) se disminuye la ocurrencia del comportamiento de “congelamiento” (10); sin embargo, podría inferirse que existe algún sustrato neuroanatómico donde el PPNL altere el proceso emocional y mnemónico porque éste cruza la barrera hematoencefálica (Kurihara *et al.* 1987; Pardridge *et al.* 1984).

Se han hecho estudios en humanos que evalúan funciones cognitivas hallando que los beta bloqueadores atenúan en proporción similar la ansiedad producida por las pruebas, sin importar si cruzan la barrera hematoencefálica, lo cual apuntaría a favor de una regulación “intrínseca” de la ansiedad (Schweizer *et al.* 1991); así mismo existen evidencias experimentales de la manipulación de los receptores beta-adrenérgicos en ratones que se expusieron a la prueba del LCE usando el L-propranolol como fármaco bloqueador y el Isoproterenol como estimulante, los resultados muestran que los animales tratados con Isoproterenol presentaron en mayoría el repertorio comportamental de tipo ansioso de forma dosis-dependiente mientras que en los animales tratados con L-propranolol este repertorio se atenuó significativamente como consecuencia de un efecto de tipo ansiolítico (Gorman y Dunn 1993). A partir de estos hallazgos, se podría inferir que al atenuar las respuestas autonómicas del sistema nervioso se puede generar un

efecto ansiolítico mucho más marcado y en el caso del Atenolol, con escasas consecuencias farmacológicas a nivel del sistema nervioso central.

Se ha demostrado con suficiente claridad el mecanismo por el cual el propranolol cruza dicha barrera y que tiene efectos en la remodelación de estructuras cerebrales (Kurihara et al. 1987). Considerando el problema a tratar en este proyecto, uno de los inconvenientes de este tipo de fármaco es que como el Propranolol cruza la barrera hematoencefálica, sus efectos comportamentales y mnemónicos son el resultado de mecanismos de acción tanto central como periférica. De esta manera, no se puede avanzar en conclusiones que apunten a la discusión sobre el papel del nivel de activación autonómica periférica. El Atenolol es un bloqueador adrenérgico hidrofílico que en condiciones normales cruza muy poco la barrera hematoencefálica (Agon et al. 1991; de Lange et al. 1995; McAinsh y Cruickshank 1990).

5.6. ANÁLISIS DE VARIABILIDAD Y SISTEMAS BIOLÓGICOS COMPLEJOS.

Con el reciente desarrollo de las computadoras se ha facilitado el análisis de los *ritmos*, los cuales son patrones característicos de variaciones en un determinado tiempo y que a pesar de su dinámica intrínseca y las relaciones interdependientes y no lineales de sus partes exhiben una robusta estabilidad si se les aborda como un solo sistema (Seely y Macklem 2004). El sistema nervioso autónomo es un ejemplo de un sistema complejo que se autorregula dependiendo de los estímulos externos que recibe. Es frecuente encontrar resultados experimentales que hacen alusión a valores de tendencia central de grupos de datos, sin embargo, las oscilaciones de la variable medida, pueden indicar estados correspondientes a cambios instantáneos o sugerir estados de regulación de un sistema dinámico.

El término *sistema nervioso autónomo* fue presentado por J. N. Langley a principios del siglo 20 para designar a aquellos nervios relacionados con la regulación de las funciones corporales. Los nervios autonómicos comprenden a los *simpáticos* (ramas toracolumbares) y los *parasimpáticos* (ramas craneales y del sacro); los nervios aferentes y eferentes contienen fibras mielinizadas y no mielinizadas, que se implantan en los distintos órganos en los que ejercen su acción (Hainsworth 1998).

El sistema nervioso autónomo (SNA) es el sistema de neuronas que controla órganos viscerales, efectores en la piel y el sistema cardiovascular. Por definición, los efectos del SNA no están bajo el control voluntario incluyendo a todos los órganos y tejidos inervados del cuerpo excepto el músculo estriado, aunque hay algunas excepciones a ésta afirmación como puede considerarse con el esófago y los músculos de la respiración; en el primero no hay control voluntario a pesar de ser un músculo estriado y en el segundo el patrón habitual de actividad de los músculos obedece a reflejos automáticos cuyos centros neuronales se hallan en el

tallo cerebral y se comportan de forma similar a los que gobiernan el sistema cardiovascular, sin embargo, se puede ejercer un control voluntario de los movimientos respiratorios (Furness 2006).

El SNA inerva a los órganos de las cavidades esplácnicas (pulmones, corazón, riñones, vejiga, órganos digestivos y gónadas). Además de estos órganos y tejidos, también se responsabiliza de la secreción de glándulas exocrinas y endocrinas (páncreas, salivales, sudoríparas, lacrimales, suprarrenales) actuando en sinergia con el sistema endocrino, y desde este enfoque podría considerarse que son un solo sistema al que se le ha zanjado una brecha desde hace largo tiempo para simplificar el estudio de estos órganos.

5.6.1. Aplicación a los sistemas biológicos

Los sistemas biológicos son sistemas complejos, desde el punto de vista espacial y temporal, pues están contruidos por una red dinámica de *circuitos* retroalimentados que son interdependientes, redundantes y con diversas manifestaciones (Seely y Macklem 2004). Las propiedades del sistema son diferentes a las de sus componentes, muchas veces no pueden distinguirse por separado sino en una interacción que les permite mantener un equilibrio dinámico conocido como *homeóstasis* (Cannon 1932) con el fin de mantener la constancia en la composición, propiedades, estructura y/o rutinas del medio interno de un organismo o sistema influido por agentes externos (en su mayoría) e internos .

Cuando se presenta un quebrantamiento o una modificación de las propiedades del sistema, hay alteraciones de las funciones que varían en severidad, estabilidad y duración lo cual deriva en una disfunción fisiológica que se reconoce como enfermedad. En este contexto, el estudio de las variaciones en las manifestaciones biológicas reguladas por el sistema nervioso autónomo, permite tener una idea dinámica de los cambios en la regulación de cada uno de ellos y por tanto, una idea del estado o las condiciones de los reguladores autonómicos en los momentos de activación o de interés del investigador.

5.6.2. Análisis de la variabilidad de la Frecuencia Cardiaca

El análisis de la variabilidad que presenta la frecuencia cardiaca (**HRV**) permite adentrarse en el control neurológico del corazón, dando paso a una nueva disciplina, la *neurocardiología* (Natelson 1985) la cual estudia las interacciones entre el corazón y el cerebro y las ha estudiado en diversas situaciones como las arritmias, la apoplejía, la muerte súbita cardiaca, epilepsia y estrés ambiental (Davis y Natelson 1993). El corazón responde a los estímulos que sobre el ejerce el sistema nervioso autónomo, si hay aumento de la actividad vagal entonces se reduce la frecuencia cardiaca (FC) y aumentará la HRV, mientras que el estímulo

simpático producirá un aumento de la FC y disminuirá la HRV (Berger *et al.* 1989; Randall y Ardell 1988).

El análisis puede realizarse en segmentos cortos de trazado electrocardiográfico (EKG) en periodos que van desde 0.5 a 5 minutos y en los realizados durante 24 horas o períodos más prolongados como los que pueden obtenerse con un examen Holter. El análisis en el dominio del tiempo usando métodos estadísticos permite medir parámetros de la HRV derivados directamente de los intervalos R-R del electrocardiograma (van Ravenswaaij-Arts *et al.* 1993).

El análisis en el dominio de la frecuencia, representado por el análisis espectral de la variación de la frecuencia cardiaca en un conjunto de intervalos, provee marcadores del tono simpático y parasimpático, además ha contribuido con nuevas aproximaciones sobre la regulación autonómica cardiovascular (Akselrod *et al.* 1981; Akselrod *et al.* 1985; Cerutti *et al.* 1991; Pagani *et al.* 1993; Pomeranz *et al.* 1985) . Sin embargo éste es un análisis mucho más exigente en los datos que necesita, puesto que requiere cierto grado de *inmovilidad* del sujeto y que la señal en estudio que se registra sea estable (estos dos atributos son definidos comúnmente como *stationarity*) para que se registren únicamente las condiciones o cambios del proceso fisiológico que se encuentra en curso (Hartikainen *et al.* 1998).

5.6.2.1. Análisis de HRV en el dominio del tiempo

Se distinguen 2 tipos de análisis de variabilidad, los de corto plazo (**STV**) que representan los cambios rápidos de la frecuencia a través del análisis de latido a latido y los de largo plazo (**LTV**) que muestran fluctuaciones más lentas que en humanos no van más allá de 6 por minuto por lo general.

Una medición de STV muy utilizada es la desviación estándar de la diferencia de los intervalos R-R (**SDNN**) latido a latido dentro del periodo de tiempo seleccionado, habitualmente menor a 1 minuto. Hay otras mediciones desarrolladas con la finalidad de aislar las fluctuaciones de corto y largo plazo, los cálculos que permiten evaluar estas últimas son: SDANN, RMSSD, pNNx, NNx, SDSD que se presentan en la Tabla 1 (Hartikainen, Tahvanainen, y Kuusela 1998; Seely y Macklem 2004).

Para la medición de índices de LTV se realiza la SD de todos los intervalos R-R o a diferencia de la duración entre el máximo y mínimo intervalo R-R dentro del periodo seleccionado (de minutos a horas); a través de estos cálculos se pueden detectar los ritmos ultradianos de la frecuencia cardiaca, es decir, aquellos que se presentan en intervalos mayores a una hora.

Tabla 1. Parámetros de análisis de variabilidad en dominio del tiempo para el electrocardiograma.

Parámetro	Unidad	Definición
SDNN	ms	Cálculo de la desviación estándar de todos los intervalos R-R normales registrados durante cierto periodo de tiempo del EKG.
SDANN	ms	Cálculo la desviación estándar del promedio de los todos intervalos R-R normales registrados durante cierto periodo de tiempo del EKG.
pNNx	%	Evaluación de todos los registros de EKG para contar los intervalos R – R normales con diferencia mayor de 5, 10, 20 y 25 milisegundos. Éste cálculo se realiza a partir de los valores absolutos de la diferencia obteniéndose un porcentaje de eventos de determinada diferencia en milisegundos.
RMSSD	ms	Cálculo de la raíz cuadrada del promedio de la suma de los cuadrados de las diferencias entre cada intervalo R-R con su predecesor.
NNx	n	Conteo de intervalos R-R mayores de X cantidad de milisegundos en la muestra.
SDSD	ms	Desviación estándar de las diferencias entre intervalos R – R adyacentes.

5.6.2.2 Análisis de HRV en el dominio de la frecuencia

Estos métodos requieren de gran cantidad de datos y sobretodo exigen que la señal tenga el atributo de “estacionalidad” (*stationarity*) puesto que es sensible a las fluctuaciones. Los métodos más utilizados son la Transformada Rápida de Fourier (**FFT**) y la Transformada de Wavelet (**TW**), esta última es mucho más flexible y probablemente más adecuada para señales no estacionarias. Debido a que en el presente trabajo de investigación se hicieron registros cortos de EKG y no se utilizó este tipo de análisis no se profundizará en el tema; no obstante, para el lector interesado existen 2 excelentes revisiones sobre este tema (Hartikainen, Tahvanainen, y Kuusela 1998; Seely y Macklem 2004).

5.6.2.3. Otros métodos de análisis de variabilidad

Se han desarrollado otros métodos que pueden permitir la obtención de factores pronósticos de utilidad sobretodo en aplicaciones clínicas, ellos son el análisis de fractales (**Power Law**), el análisis de entropía (**ApEN**) y el análisis de fluctuaciones desligadas (**DFA**). Estos métodos requieren enormes cantidades de datos para producir resultados significativos, los autores de una excelente revisión proponen unos parámetros estimados para poder realizar cálculos confiables (Seely y Macklem 2004).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en 3 fases: **primera**, explorar los hallazgos de variables fisiológicas y electrocardiografía en ratas Wistar (*experimentos 1 y 2*) sin intervenciones ni manipulación, así como con la inyección intraperitoneal del vehículo con que después se inyectarían los diferentes fármacos a estudiar; **segunda**, determinación de los efectos fisiológicos de diferentes dosis de Adrenalina, un fármaco agonista adrenérgico de acción periférica, a utilizar para decidir en cuál de ellas se observaban más claramente los efectos y a partir de esto decidir la dosis a utilizar en los experimentos que involucrarían evaluación del comportamiento en el LCE (*experimento 3, etapas 1 y 2*), o para corroborar los reportes ya existentes en las publicaciones de otros grupos investigadores; **tercera**, estudio de las variables fisiológicas y del comportamiento de las ratas sometidas a la prueba de LCE con diferentes intervenciones farmacológicas y sus respectivos grupos de control (*experimento 4, etapas 1 y 2*) en las que se evaluó también la presentación del fenómeno de *One Trial Tolerance*.

6.1. DISEÑO

Estudio ciego y experimental.

6.2. CONDICIONES GENERALES DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas Wistar macho provenientes del Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, en Bucaramanga, Colombia. Se alojaron en grupos de 6 ratas por jaula, con periodos de iluminación controlados (ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, desde las 07 hasta las 19 h), con acceso controlado al alimento (1 ración al día) y libre acceso al agua; las condiciones ambientales fueron controladas (ambiente de bajo ruido; temperatura de $20,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$; humedad relativa de $62\% \pm 5\%$).

Los animales fueron trasladados del bioterio de reproducción al de experimentación un día antes de la primera sesión de cada experimento donde permanecieron hasta culminar cada uno de ellos. La sala de experimentación estaba contigua al bioterio experimental y las condiciones ambientales de temperatura y humedad de ambas salas, fueron semejantes a las del bioterio de origen. La ubicación de los animales en el bioterio experimental se realizó cuidadosamente procurando que hubiera una distribución balanceada entre los grupos y los niveles de los estantes donde fueron colocadas las jaulas. Esto último con la intención de balancear entre los grupos, los niveles de luminosidad durante

su permanencia en este lugar. Se realizaron las sesiones experimentales entre las 13 y 18 horas con condiciones de iluminación, temperatura y humedad similares a las del bioterio experimental. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Dirección de Investigaciones de la Universidad Industrial de Santander. Los animales utilizados en el presente proyecto de investigación fueron manejados acorde a las disposiciones del Animal Welfare Act¹ y acorde a las normas colombianas vigentes².

6.3. CONSIDERACIONES GENERALES DEL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO

El Laberinto en Cruz Elevado (LCE) es un dispositivo fabricado en madera con cuatro brazos distribuidos en forma de cruz teniendo 90° de ángulo entre los ejes de cada uno de sus brazos, es decir, se encuentran opuestos entre sí por pares como puede observarse en la Figura 2. Cada brazo mide 500 x 120 mm desde su salida y está ubicado sobre unos soportes que lo sostienen a 500 mm. del piso. El centro se forma al unirse la prolongación de los 4 brazos, tiene un área de 14400 mm² que resulta de los 120 mm correspondientes a cada brazo.

Tiene 2 “brazos cerrados” (BC) cuyas paredes laterales son de 400 mm. de altura, fabricadas en madera y dispuestas en los 3 lados que se exponen al vacío quedando libre el centro del laberinto, siendo éste el sitio por donde se tiene acceso a los BC.

Los otros 2 brazos son llamados “brazos abiertos” (BA), los cuales tienen las mismas dimensiones que los cerrados pero carecen de paredes laterales y en lugar de ello dispone de unas pestañas de acrílico transparente de 13 mm. de altura.

Las superficies del laberinto carecen de irregularidades u otra alteración, está forrado en un material sintético y liso llamado fórmica para brindarle resistencia al uso y a las sustancias de limpieza.

El laberinto fue situado en un cuarto de experimentación con condiciones ambientales similares a las del bioterio donde fueron mantenidas las ratas, estas son: humedad relativa de 62% ± 5 %, temperatura de 20,5 ± 1°C; luminosidad en el centro 300 lux.

¹ Disponible en <http://www.nal.usda.gov/awic/legislat/regsqa.htm>

² Resolución 8430 de 1993 y Ley 84 de 1989.

Figura 2. Diseño esquemático del Laberinto en Cruz Elevado (LCE) con sus respectivas dimensiones.

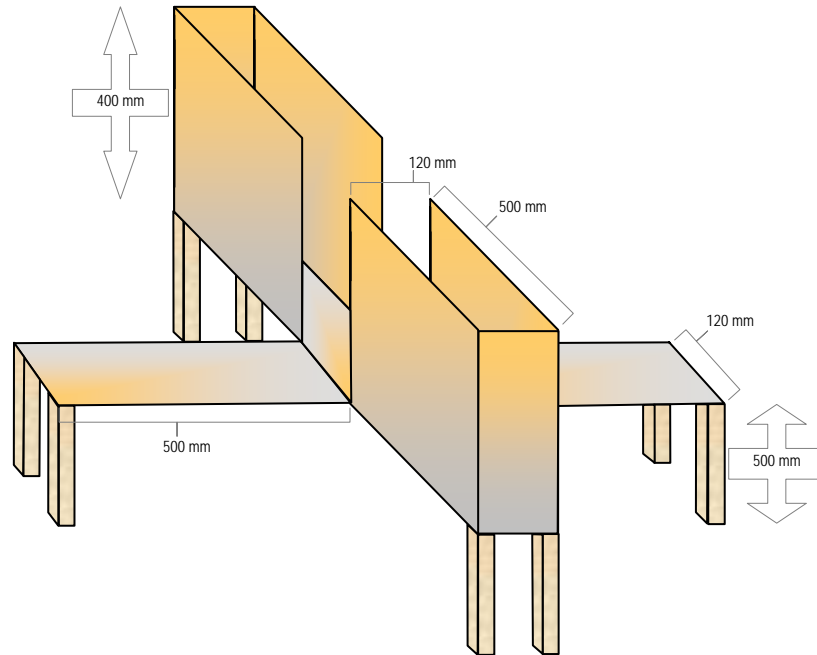


Figura 3. Fotografía de una sesión experimental en el Laberinto en Cruz Elevado.



6.4. FÁRMACOS Y REACTIVOS

Para éste estudio se utilizaron las siguientes preparaciones farmacológicas: Adrenalina (Labs. Baxter; Colombia) ampollas de 1 mg/mL; Midazolam (Dormicum®, ROCHE) ampollas de 5 mg/5mL; Solución Salina Fisiológica (concentración 0,9% P/V; Labs. Quibi; Colombia); Atenolol (A7655-5G; Sigma Aldrich; St. Louis, MO, U.S.A.); Lidocaína al 2% (Junicaina®; Labs. Junín, Colombia). Se utilizaron jeringas (Ind. Rymco; Colombia) de 1 mL, 3mL, 10 mL. Se utilizaron agujas de 24G y 30G (Ind. Rymco; Colombia). Para hacer los implantes que transmitirían la señal de EKG en el dorso de las ratas se usaron hilos de cobre (Ind. Centelsa; Colombia). Además, se utilizaron los siguientes reactivos químicos: Cal Sodada, granulada (Soda Lime®; Reactivos RD, Colombia); alcohol antiséptico (Labs. Tecnoquímicas, Colombia)

6.5. ADQUISICIÓN DE DATOS DE VARIABLES FISIOLÓGICAS

6.5.1. Electrocardiografía y medición de frecuencia cardiaca (FC).

Para poder comunicar los electrodos puestos en las ratas con los terminales de registro electrocardiográfico, se construyeron unos “conductores” pasando unas agujas metálicas a través del tapón de caucho que cerraba el tubo donde se alojaba al animal durante esta parte del experimento. A estas agujas conductoras se les unía con soldadura a unos cables aislados que terminaban en unas pinzas de sierra que se ajustaban al hilo de cobre implantado en la rata; la resistencia del sistema conductor construido nunca fue mayor a 1 mOhm ($m\Omega$). Al probarse la resistencia desde las pinzas de sierra hasta el contacto del cable conector con el equipo de registro, siempre se encontró por debajo de 1 $m\Omega$.

Figura 4. Fotografía del montaje con el polígrafo Nihon Kohden.



Inicialmente se utilizó un polígrafo análogo (Nihon Kohden, modelo VC 640G; Japón) para el registro de la frecuencia cardíaca y los electrocardiogramas. Se tomaron registros impresos sobre papel milimetrado (Evertrace; Nihon Kohden, Japón) a 25 milímetros por segundo (mm/seg.) y una sensibilidad de 0,5 mV/cm, los cuales fueron digitalizados después con un escáner de imágenes (HP2300, Hewlett Packard, U.S.A) para su posterior medición a través de un programa de análisis de imágenes (Image Tools, desarrollado en el Health Science Center de San Antonio, Texas perteneciente a la Universidad de Texas y disponible en Internet por FTP anónimo desde maxrad6.uthscsa.edu).

A partir del experimento número 3 en la etapa 2 se tomaron los registros de electrocardiografía a través de un equipo digital (PowerLab® 16/30; ADInstruments, Australia) y se grabaron en una estación de trabajo para su análisis posterior. El equipo PowerLab viene acompañado de un software (Chart® v5.2; ADInstruments, Australia) para el procesamiento de señales adquiridas, lo que hizo posible generar en tiempo real el cálculo de la diferencia en los intervalos R – R y el cálculo de la frecuencia cardíaca.

El día previo a la primera sesión del experimento se colocaron implantes de hilo de cobre en el dorso de las ratas utilizando anestesia local con Xylocaína a 2% sin adición de epinefrina y ubicados en los puntos correspondientes para obtener una derivación tipo DII puestos así: región escapular izquierda, región escapular derecha y región lumbar izquierda. Esta disposición se hizo con la finalidad de registrar una derivación tipo DII a partir del hecho que las ratas en su mayoría tienen el corazón en la región izquierda del tórax y su ápice está dirigido ligeramente hacia abajo, a partir de esto se generó el supuesto que pregonaba porque presentase un eje cardíaco similar al del humano y en éste último, la derivación DII es la que mejor muestra las ondas que se registran en electrocardiografía. El día del experimento los hilos de cobre se conectaban a las pinzas de sierra que conducirían la señal hasta el aparato de registro.

6.5.2. Medición del consumo de Oxígeno (VO₂)

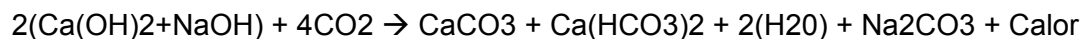
Se realizó dentro de un tubo acrílico de con cierre hermético, el cual se logró al ponerle un tapón de caucho que tenía un único orificio donde se colocaba a presión una pipeta de 10 mL (No. 7085; Pirex, U.S.A.) de forma que no se perdiera el hermetismo del sistema. Se hizo registro del tiempo transcurrido para que se desplazara una burbuja de agua jabonosa a lo largo de 9 mL aforados en la pipeta, se tomó registro de la temperatura y humedad relativa del ambiente cuando se ejecutaba el experimento en condiciones ATPS (Ambient Temperature and Pressure Saturated air with water vapor) para luego poder convertir los datos del consumo de Oxígeno a condiciones STPD (Standard Temperature and Pressure, Dry Air) y expresarlos como mililitros de Oxígeno consumidos por kilogramo de peso corporal por unidad de tiempo (mL/Kg/min).

Figura 5. Fotografía del montaje de la cámara hermética para registrar el consumo de oxígeno.



El registro del consumo de oxígeno a través del desplazamiento de una burbuja de jabón en la pipeta. Así mismo, se observan los cables para registro de electrocardiograma.

Para asegurar que el movimiento de la burbuja de agua jabonosa en la pipeta correspondiera a la demanda de oxígeno desde el interior del sistema se colocó una bolsa de malla conteniendo cal sodada, se hizo esto con la finalidad de realizar la sustracción del CO₂ generado por la respiración de la rata fuera retirado del sistema y permitir la ocurrencia de la siguiente reacción química:



Se realizaron 3 mediciones del consumo de Oxígeno por cada animal en cada una de las fases de registro.

6.5.3. Medición de la frecuencia respiratoria (FR)

Se realizó inspección visual de los movimientos del abdomen del animal estando dentro del tubo hermético, se tomó el registro de estos movimientos durante 1 minuto.

6.6. MANIPULACIÓN Y OTRAS CONSIDERACIONES

6.6.1. Pesaje de los animales

En una báscula mecánica (Ohaus; NJ, U.S.A.) se pesaron los animales utilizados en el experimento, los cuales iban dentro de una cesta metálica. Siempre se taró la báscula antes de pesar cada animal. El pesaje se realizó dentro de las instalaciones del laboratorio de experimentación y con los animales en ayuno del mismo día. Las raciones de comida se administraban a las 17 horas, pero el día del experimento sólo se administraban hasta que éste hubiese concluido.

6.6.2. Manipulación

No se hizo manipulación alguna de las ratas antes de someterlas al experimento.

6.7. PROCEDIMIENTOS DETALLADOS

6.7.1. EXPERIMENTO NÚMERO UNO.

6.7.1.1. Objetivo

Estandarizar una técnica de adquisición de electrocardiograma, consumo de oxígeno y variables fisiológicas en ratas Wistar en “estado basal”.

6.7.1.2. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho, con peso de 254 ± 14 gramos ($n= 18$) provenientes del Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, en Bucaramanga, Colombia. Se alojaron en grupos de 6 ratas por jaula, con periodos de iluminación controlados (ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, desde las 07 hasta las 19 h), con acceso controlado al alimento (1 ración al día) y libre acceso al agua; las condiciones ambientales fueron controladas (ambiente de bajo ruido; temperatura de $20,5 \pm 1^\circ\text{C}$; humedad relativa de $62\% \pm 5\%$).

6.7.1.3. Metodología

Se prepararon los animales para tomarles el EKG como se describió anteriormente; el día del experimento se tomó cada animal y se conectó a los cables para tomar el registro de EKG. Después se introdujo al animal en la cámara para aislarlo del ambiente y tomar los datos de consumo de oxígeno.

Se tomaron registros de la FC y la FR así como el VO₂ acorde a la metodología anteriormente descrita. No se tomaron registros impresos de EKG en éste experimento; se leyó la frecuencia cardiaca desde la pantalla del polígrafo de registro (Nihon Kohden). Todos los datos fueron ingresados en una hoja de cálculo para análisis posterior.

6.7.2. EXPERIMENTO NÚMERO DOS.

6.7.2.1. Objetivo

Evaluación de los parámetros fisiológicos (FC, FR, VO₂) en condiciones basales y después de la inyección de Solución Salina Normal (**SSN**)

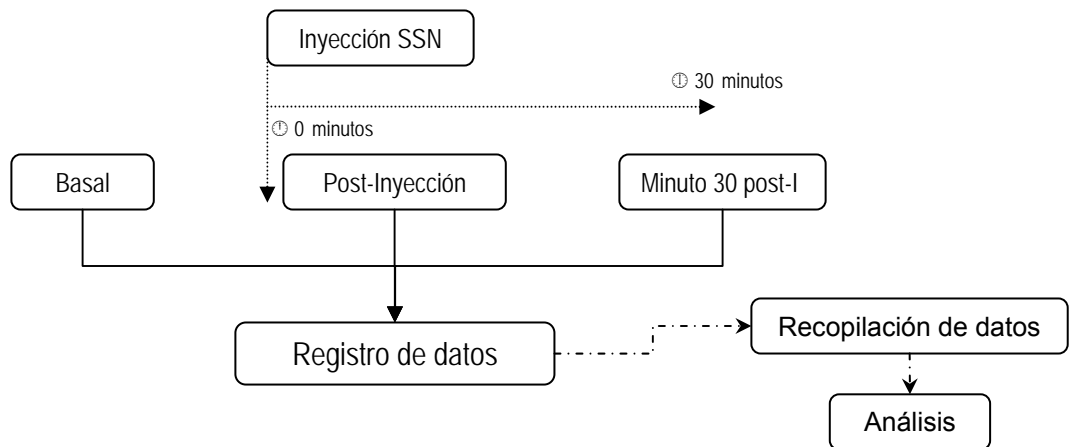
6.7.2.2. Animales

Se utilizaron ratas Wistar de 223 ± 9 gramos ($n= 6$) con las condiciones uniformes arriba descritas; los animales no habían sido manipulados previamente. Todos los animales se alojaron en la misma jaula.

6.7.2.3. Procedimiento

Se prepararon los animales para la evaluación electrocardiográfica sí como para tomar los registros de FC, FR y VO₂ acorde a la metodología ya descrita. Se hizo un registro basal de cada uno de ellos y después de eso se les administró SS al 0,9% por vía intraperitoneal (**i.p.**). en dosis de 1 mL x Kg , acto seguido se procedió a tomar un nuevo registro de las variables fisiológicas; después se alojó a los animales en su respectiva jaula y 30 minutos después de haberles inyectado la SSN se les tomó un nuevo registro de EKG y variables fisiológicas. Una vez hecho esto se retiraron los implantes y se regresaron a la jaula donde estaban alojados.

Figura 6. Diseño operativo del experimento número 2.



Diseño operativo del experimento número 2, en línea punteada se presenta la línea de tiempo.

No se tomaron registros impresos de EKG en éste experimento pues no se contaba con un aparato que registrara en papel la señal impresa. Todos los datos fueron ingresados en una hoja de cálculo para análisis posterior.

6.7.3 EXPERIMENTO NÚMERO TRES, ETAPA 1.

6.7.3.1. Objetivo

Evaluación del efecto de la inyección de Adrenalina (**ADR**) i.p. en diferentes concentraciones sobre los parámetros fisiológicos y electrocardiográficos en ratas Wistar.

6.7.3.2. Animales

Se utilizaron ratas Wistar de 223 ± 9 gramos ($n= 15$) con las condiciones uniformes arriba descritas; los animales no habían sido manipulados previamente. Cada animal fue asignado a uno de los 3 grupos del experimento usando una tabla de números aleatorios. Los animales fueron alojados en grupos de 5 por cada jaula.

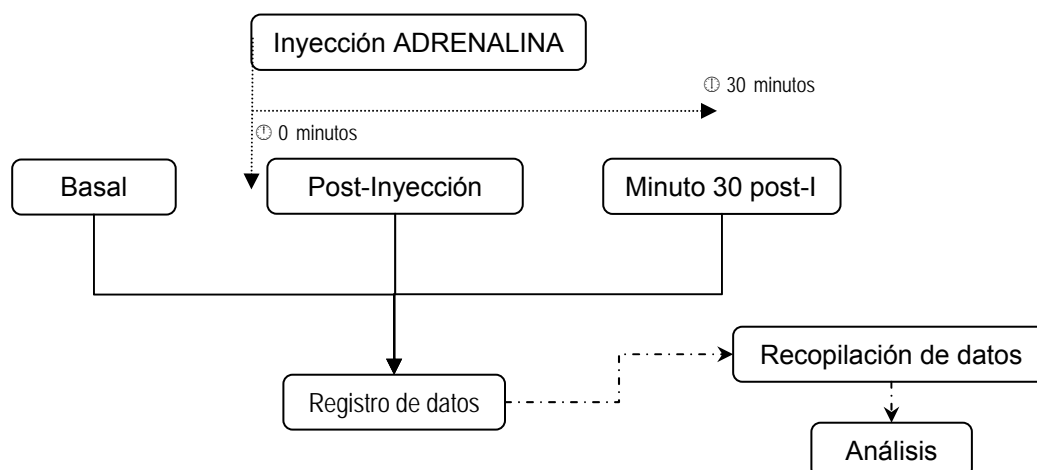
Tabla 2. Distribución de los grupos de animales acorde a la dosis de Adrenalina utilizada en el experimento 3, etapa 1.

grupo	n	Dosis Adrenalina
A	5	0,05 mg / Kg
B	5	0,01 mg / Kg
C	5	0,1 mg / Kg

6.7.3.3. Procedimiento

Se prepararon los animales para tomar registros de EKG, FC, FR y VO₂ acorde a la metodología ya descrita. Se hizo un registro basal de cada uno de ellos y después de eso se les administró Adrenalina por vía i.p. en la dosis asignada para su respectivo grupo acorde a lo presentado en la Tabla 2, acto seguido se procedió a tomar un nuevo registro de EKG así como de las demás variables fisiológicas; después se alojó a los animales en su respectiva jaula y 30 minutos después de haberles inyectado la Adrenalina se les tomó un nuevo registro de EKG y variables fisiológicas. Una vez hecho esto se retiraron los implantes y se regresaron a la jaula donde estaban alojados.

Figura 7. Diseño operativo del experimento número 3, etapa 1.



Diseño operativo del experimento número 3 etapa 1, la línea de tiempo se presenta punteada.

Se tomaron registros impresos de EKG que luego fueron escaneados (HP2300, Hewlett Packard, U.S.A.) y procesados con el software Image Tools (Health Science Center; San Antonio, Texas) en una computadora (HP DV1015LA; Hewlett Packard, U.S.A.) para medición de los intervalos R-R; los demás datos fueron almacenados en una hoja de cálculo para análisis posterior.

6.7.4. EXPERIMENTO NÚMERO TRES, ETAPA 2.

6.7.4.1. Objetivo

Determinación del efecto agudo de la inyección intraperitoneal de Adrenalina (ADR) en ratas sometidas a la prueba de Laberinto en Cruz Elevado (LCE)

6.7.4.2. Animales

Se utilizaron ratas Wistar de 240 ± 20 gramos ($n= 20$) con las condiciones uniformes arriba descritas; los animales no habían sido manipulados previamente. Cada animal fue asignado a uno de los 2 grupos del experimento usando una tabla de números aleatorios. Se alojaron en grupos de 5 animales por caja.

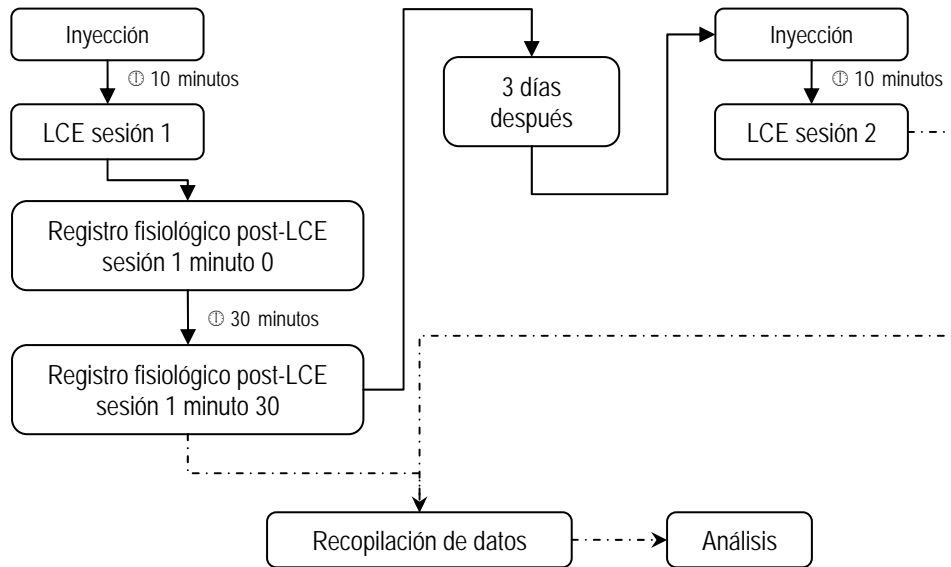
Tabla 3. Distribución de los grupos de animales acorde a la sustancia utilizada en el experimento 3, etapa 2.

grupo	n	Fármaco y Dosis
A	11	Adrenalina - 0,1 mg / Kg
B	9	SS 0,9% - 1 mL / Kg

6.7.4.3. Procedimiento

En éste experimento se prepararon los animales al día anterior para tomar registros de EKG, FC, FR y VO₂ acorde a la metodología ya descrita. El día de la prueba (Figura 8), 10 minutos antes de someterles al LCE se les administró por vía i.p. la dosis de la sustancia a la que habían sido asignados para su respectivo grupo acorde a lo presentado en la Tabla 3; al terminar la sesión en el LCE se tomó un registro de EKG así como de las demás variables fisiológicas, después se alojó a los animales en su respectiva jaula y 30 minutos después de haber salido del LCE se les tomó un nuevo registro de EKG y variables fisiológicas. Después se regresaron a la jaula donde estaban alojados y fueron trasladados al bioterio experimental.

Figura 8. Diseño operativo del experimento número 3, etapa 2.



Diseño operativo del experimento número 3 etapa 2, se presenta el tiempo predeterminado entre las etapas.

Tres días después se ejecutó la segunda sesión del experimento, se les aplicó SS a todos los animales en la misma dosis que recibieron durante la primera sesión y con igual periodo de anticipación; después fueron sometidos nuevamente al LCE y al terminar el tiempo de 300 segundos fueron retirados del LCE y se regresaron a la jaula donde estaban alojados.

6.7.5. EXPERIMENTO NÚMERO CUATRO, ETAPA 1.

6.7.5.1. Objetivo

Determinar el efecto en las variables fisiológicas de la premedicación con Midazolam (**MDZ**) seguida de la inyección con Solución Salina 0,9% p/v (**SS**) o Atenolol (**AT**).

6.7.5.2. Animales

Se utilizaron ratas Wistar de 280 ± 18 gramos ($n= 24$) con las condiciones uniformes arriba descritas; los animales no habían sido manipulados previamente. Cada animal fue asignado a uno de los 4 grupos (Tabla 4) del experimento usando una tabla de números aleatorios. Se alojaron en grupos de 6 animales por caja.

Tabla 4. Distribución de los grupos de animales acorde a la sustancia utilizada en el experimento 4 etapa 1, con sus respectivas dosis.

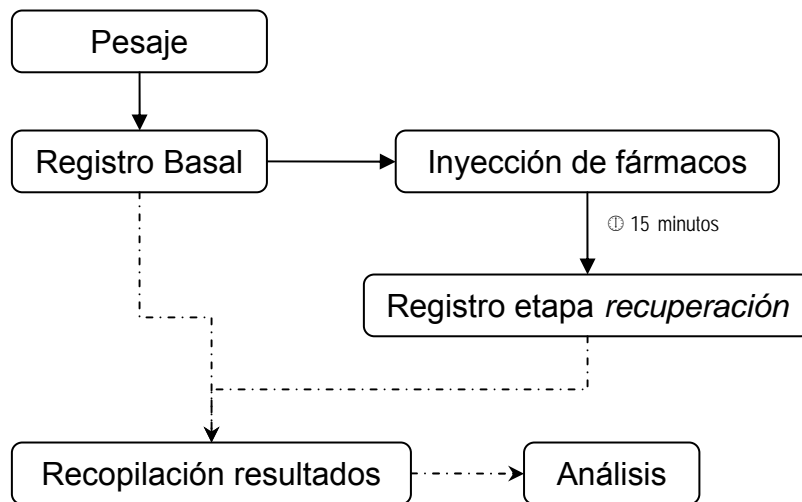
Grupo	n	Primer Fármaco	Segundo Fármaco
MA	6	Midazolam 0,5 mg/Kg	Atenolol – 3 mg / Kg
SA	6	SS 0,9% – 1 mL / Kg	Atenolol – 3 mg / Kg
SM	6	Midazolam 0,5 mg/Kg	SS 0,9% – 1 mL / Kg
SS	6	SS 0,9% – 1 mL / Kg	SS 0,9% – 1 mL / Kg

6.7.5.3. Procedimiento

Se prepararon los animales al día anterior para tomar registros de EKG, FC, FR y VO₂ acorde a la metodología ya descrita. El día de la prueba (Figura 9) se pesó a cada animal antes de hacerle un registro basal de sus variables fisiológicas y EKG; después de haber tomado el registro basal, se les administró una inyección vía i.p. de cada fármaco referenciado en la Tabla 4, en total cada animal recibió 2 pinchazos en sitios separados y fue regresado a la jaula donde estaba alojado durante 15 minutos y después de haber pasado ese tiempo se volvió a tomar registro de sus variables fisiológicas y de EKG. Al terminar el registro de la etapa de *recuperación*, es decir, el que fue realizado 15 minutos después de inyectar las sustancias se retiraron los implantes de las ratas y fueron regresadas a su respectiva jaula de alojamiento.

El propósito de hacer un registro 15 minutos después de haber inyectado los fármacos fue tener un conjunto de datos similar al que se generaría al realizar el experimento número 4 etapa 2, en dicho experimento se le inyectó a las ratas los mismos grupos de soluciones 10 minutos antes de someterlas a la prueba de LCE durante 5 minutos y al terminar la prueba se haría un registro de EKG y variables fisiológicas, teniendo entonces que el registro posterior a la prueba de LCE ocurriría 15 minutos después de haber inyectado las soluciones por vía i.p. a las ratas del experimento.

Figura 9. Diseño operativo del experimento número 4, etapa 1.



Diseño operativo del experimento número 4 etapa 1, se presentan los tiempos entre las etapas críticas.

No se realizaron registros de 30 minutos después de la inyección de las soluciones porque en experimentos preliminares se halló que no había diferencias en los registros de EKG y variables fisiológicas obtenidos a 15 y 30 minutos de la etapa de recuperación (datos no presentados).

6.7.6. EXPERIMENTO NÚMERO CUATRO, ETAPA 2.

6.7.6.1. Objetivo

Determinar el efecto del bloqueo beta-adrenérgico (AT) en asociación con ansiolítico (MDZ) o con placebo (SS) en la prueba de LCE en 2 sesiones experimentales y en las variables fisiológicas.

6.7.6.2. Animales

Se utilizaron ratas Wistar de 229 ± 20 gramos ($n= 36$) con las condiciones uniformes arriba descritas; los animales no habían sido manipulados previamente. Cada animal fue asignado a uno de los 4 grupos (Tabla 5) del experimento usando una tabla de números aleatorios. Se alojaron en grupos de 6 animales por jaula.

Tabla 5. Distribución de los grupos de animales acorde a la sustancia utilizada en el experimento 4 etapa 2, con sus respectivas dosis.

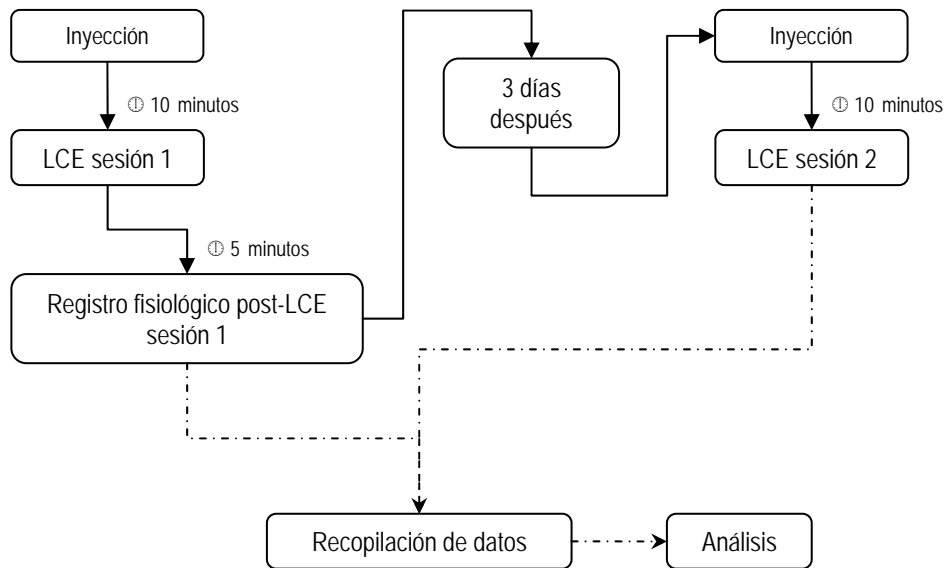
Grupo	n	Primer Fármaco	Segundo Fármaco
MA	9	Midazolam 0,5 mg/K	Atenolol – 3 mg / Kg
SA	9	SS 0,9% – 1 mL / Kg	Atenolol – 3 mg / Kg
SM	9	Midazolam 0,5 mg/K	SS 0,9% – 1 mL / Kg
SS	9	SS 0,9% – 1 mL / Kg	SS 0,9% – 1 mL / Kg

6.7.6.3. Procedimiento

En éste experimento se prepararon los animales al día anterior para tomar registros de EKG, FC, FR y VO2 acorde a la metodología ya descrita. El día de la prueba (Figura 10), 10 minutos antes de someterles al LCE se les administró por vía i.p. la dosis fármacos correspondientes al grupo que habían sido asignados para su respectivo grupo acorde a lo presentado en la Tabla 5, cada animal recibió en total 2 pinchazos y fue regresado a la jaula donde estaba alojado durante 10 minutos y después de haber pasado ese tiempo fue sometido a la prueba del LCE permitiéndosele la libre exploración durante 5 minutos; al terminar la primera sesión en el LCE se tomó un registro de EKG así como de las demás variables fisiológicas, después se alojó a los animales en su respectiva jaula y fueron trasladados al bioterio experimental.

Tres días después se ejecutó la segunda sesión del experimento, pero se les aplicó MDZ a todos los animales con la misma dosis por peso que se había administrado en la primera sesión e igual periodo de anticipación (10 minutos); después fueron sometidos nuevamente al LCE durante 5 minutos para que lo exploraran libremente y al terminar la prueba fueron retiradas del LCE y de nuevo se alojó a los animales en su respectiva jaula y regresados al bioterio experimental.

Figura 10. Esquema operativo del experimento número 4 etapa 2.



Esquema operativo del experimento número 4 etapa 2; se presentan los tiempos entre las etapas críticas.

El propósito de la segunda etapa del experimento fue evaluar el efecto de las mismas asociaciones farmacológicas de la primera etapa en el comportamiento de las ratas Wistar UIS en la prueba de exploración libre del LCE durante 5 minutos

por 2 sesiones espaciadas entre sí por 3 días para evaluar el efecto mnemónico y la presencia (o abolición) del efecto de One Trial Tolerance (OTT). Así mismo, se pretendía evaluar los hallazgos de variables fisiológicas en las ratas sometidas al LCE después de la primera sesión (**PL**) y en virtud de evitar la manipulación adicional antes de la prueba del LCE no se hizo registro basal de estas ratas tal como sucedió en el experimento que se hizo premedicación con Adrenalina para evaluar su efecto en la prueba del LCE. Se tuvieron los mismos 4 grupos experimentales y en la Tabla 6 se presenta el esquema general de las sustancias administradas para cada sesión experimental.

Tabla 6. Descripción de sustancias y dosis utilizadas en la etapa 2 del experimento 4.

Sesión 1		Sesión 2 (3 días después)
Fármacos	n	Fármacos
Solución Salina + Solución Salina	9	Midazolam 0,5 mg/Kg + Solución Salina 1 mL/Kg
Midazolam + Atenolol	9	
Solución Salina + Atenolol	9	
Solución Salina + Midazolam	9	

6.7. ANÁLISIS DE DATOS

6.7.1. Consideraciones generales

Como aproximación inicial se realizó promedio y desviación estándar (DE) de los datos obtenidos en las variables fisiológicas así como los de la prueba comportamiento (LCE); para todos se calculó el error estándar de la media (EEM). Para el caso de análisis de electrocardiografía y del comportamiento en el LCE se hicieron análisis de variabilidad en el dominio del tiempo los cuales se describen a continuación.

6.7.2. Análisis de electrocardiografía

Se hicieron análisis en dominio del tiempo de fragmentos de 1 minuto de electrocardiograma (EKG) de cada una de las ratas. Se calcularon los siguientes índices que se presentan en la Tabla 7 con sus correspondientes definiciones.

6.7.3. Análisis de variables de comportamiento

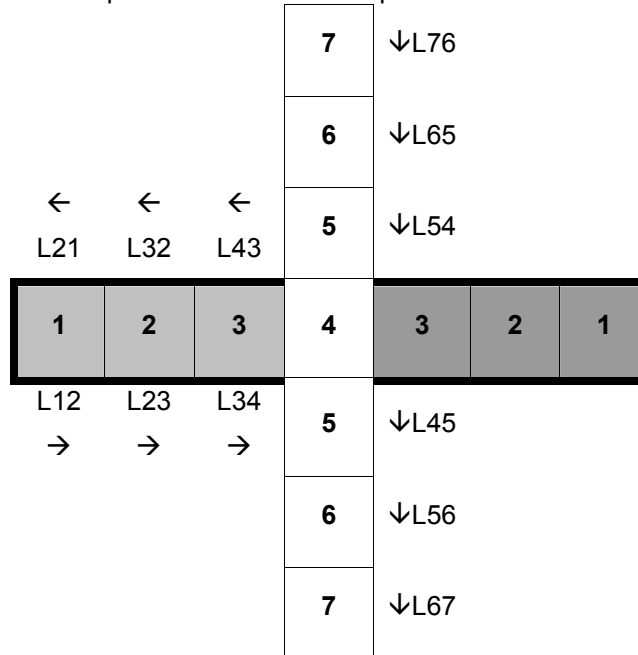
Para el análisis de los datos de comportamiento en el LCE se tuvieron en cuenta las siguientes variables presentadas en la Tabla 8 con su respectiva definición. Se utilizó el programa PROSTCOM (Conde *et al.* 2000) para el registro de las sesiones experimentales en el LCE .

Tabla 7. Parámetros de análisis de variabilidad en los electrocardiogramas de las ratas.	
Parámetro	Definición
SDNN	Cálculo de la desviación estándar de todos los intervalos R-R normales en todos los EKG registrados.
SDANN	Cálculo la desviación estándar de la diferencia de cada uno de los intervalos R-R normales respecto al promedio general de los intervalos R-R.
pNNx	Evaluación de todos los registros de EKG para contar los intervalos R – R normales con diferencia mayor de 5, 10, 20 y 25 milisegundos. Éste cálculo se realiza a partir de los valores absolutos de la diferencia obteniéndose un porcentaje de eventos de determinada diferencia en milisegundos.
RMSSD	Cálculo de la raíz cuadrada del promedio de las diferencias elevadas al cuadrado de cada intervalo R-R con su predecesor.
MIN y MAX	Valor mínimo y máximo de intervalo R-R en la muestra analizada.
RANGO FIJO	Valores absolutos y porcentuales del número de intervalos mayores a 100 milisegundos con incrementos de 1,5 mseg. en cada rango hasta llegar a un rango máximo de 250 mseg. (se crearon 100 rangos en total).

Tabla 8. Parámetros de análisis de variabilidad en los registros de comportamiento de las ratas	
Variable	Descripción
EBA	Valores absolutos (EBA) y relativos (%EBA) de las entradas a los brazos abiertos.
TBA	Tiempo de permanencia en los brazos abiertos medido en segundos, presentados en valores absolutos (TBA) y relativos (%TBA).
aDISM	Conteo de veces en que disminuyó el tiempo de permanencia en un lugar del LCE (1 a 7) en comparación con en el lugar anterior sin importar la secuencia.
%DISM	Valor porcentual de la ocurrencia de aDISM con respecto al total de eventos (disminuciones + aumentos + estables)
aAUM	Conteo de veces en que aumentó el tiempo de permanencia en un lugar del LCE (1 a 7) en comparación con en el lugar anterior sin importar la secuencia.
%AUM	Valor porcentual de la ocurrencia de aAUM con respecto al total de eventos (disminuciones + aumentos + estables)
aESTB	Conteo de veces en que tuvo igual tiempo de permanencia en un lugar del LCE (1 a 7) en comparación con en el lugar anterior sin importar la secuencia.
%ESTB	Valor porcentual de la ocurrencia de eESTB con respecto al total de eventos (disminuciones + aumentos + estables)
fSEQ	Número de veces que realizó un cambio de ubicación dentro de las posibles secuencias del LCE. Es una medida de frecuencia.
tSEQ	Sumatoria del tiempo empleado para cada una de las secuencias, se agrupan los eventos de cada categoría secuencial y se suma su tiempo.
pNNx	Es el valor porcentual de eventos con diferencia de tiempo mayor a 5 milisegundos, se estratificó en 5, 10, 20 y 30 milisegundos.

Para el análisis de las secuencias de comportamiento se dividió el LCE en 7 zonas de igual tamaño asignando un número a cada una, en la Figura 11 se presenta esta subdivisión y cada una de las secuencias posibles.

Figura 11. Divisiones del LCE para el análisis de comportamiento.



Las secuencias se muestran con flechas que indican el sentido en que se presentó el movimiento.

6.7.4. Pruebas de significancia estadística

Se hicieron análisis de varianza paramétricos (ANOVA) de una y dos vías para la evaluación de las diferentes variables entre los grupos y seguidos por pruebas t para correlaciones múltiples *post hoc* (Bonferroni) según el requerimiento necesario; en algunas variables cuya distribución no fue de tipo normal, se hicieron análisis de varianza no paramétricos (Kruskal-Wallis) seguidos por pruebas de t correlaciones múltiples *post hoc* (Student-Newman-Keuls) según la exigencia. También se hicieron pruebas T pareadas y no pareadas (Student) para la comparación de variables en las que los ANOVA no hallaron diferencias no atribuibles al azar pero que tenían un bajo poder en la prueba (valor de β menor a 0,8) y el valor de α era cercano a 0,05; así mismo, cuando se evaluó la correlación entre 2 variables se usó una correlación de Pearson para distribución de tipo normal. Para todas las pruebas estadísticas se estableció como nivel de significancia, $p < 0,05$. En los casos en que se encontró un valor de p mayor a 0,05 el poder de la prueba debía ser mayor de 0,8 para rechazar de plano la ausencia de diferencias significativas no debidas al azar, esta situación particular se hará referencia cuando sea necesario dentro de los resultados que se presentan en el siguiente apartado.

7. RESULTADOS

7.1. CONSIDERACIONES GENERALES DE LOS RESULTADOS

Los resultados fueron analizados teniendo en cuenta las tres fases experimentales en las que se llevó a cabo el presente estudio. En cada fase se analizó el impacto de diferentes factores sobre las mediciones de las variables fisiológicas y el registro electrocardiográfico. Respecto al análisis del comportamiento en la prueba de LCE se hicieron los abordajes correspondientes en cada una de las etapas respectivas.

A nivel general, las preguntas formuladas sobre las variables fisiológicas y el registro electrocardiográfico podrían resumirse en el impacto (aumento o disminución) de las diferentes intervenciones (fármacos, laberinto) en cada uno de los parámetros evaluados; así mismo se realizó con las variables del comportamiento en el LCE y algunos de los fenómenos que se presentaron en el experimento están minuciosamente descritos en la literatura científica.

7.2. RESULTADOS EXPERIMENTO NÚMERO 1

El propósito de este experimento fue evaluar los parámetros fisiológicos en condiciones basales de las ratas Wistar UIS y se realizaron registros de la frecuencia cardíaca (FC), frecuencia respiratoria (FR) y consumo de oxígeno (VO₂). En la Tabla 9 se presenta el resumen de las variables evaluadas.

Tabla 9. Resumen de las variables y sus correspondientes mediciones estadísticas.

	<i>FC</i>	<i>FR</i>	<i>VO₂</i>
Media	404.17	135.11	21.54
Error Estándar	4.61	1.67	0.63
Mediana	406.35	136.00	22.36
Desviación estándar	19.57	7.10	2.69
Mínimo	365.40	125.00	15.59
Máximo	433.70	148.00	25.84

FC, frecuencia cardíaca (ciclos/min.); FR, frecuencia respiratoria (ciclos/min.); VO₂, consumo de oxígeno en condiciones STPD (mL/Kg/min).

Para la FC se hicieron 10 mediciones espaciadas cada 20 segundos, cuando se analizaron los datos de esta variable se encontró que había una tendencia lineal

pero con muy poca tendencia al aumento o a la disminución acorde iba transcurriendo el tiempo experimental además que el índice de correlación fue bajo ($y = 0.2215x + 402.95$; $R^2 = 0.0178$). Debido a este hallazgo se decidió continuar con los 10 registros en iguales condiciones para los experimentos ulteriores.

Con relación al VO₂ en condiciones STPD se hicieron 10 medidas por cada animal de experimentación y se observó que hay una tendencia a la disminución del VO₂ a medida que la rata permanecía más tiempo dentro de la cámara hermética ($y = -0.2793x + 23.081$; $R^2 = 0.7275$), por tal razón se decidió que en los experimentos ulteriores se harían sólo 3 mediciones del parámetro de VO₂ teniendo en cuenta el anterior hallazgo para no afectar la reproducibilidad de la técnica por un fenómeno de adaptación de la rata a la cámara hermética donde se hizo la medición.

7.3. RESULTADOS EXPERIMENTO NÚMERO 2

El propósito de este experimento fue evaluar el efecto de la inyección de Solución Salina 0.9% p/v (SS) sobre las variables fisiológicas: Frecuencia cardiaca (FC), frecuencia respiratoria (FR) y consumo de oxígeno (VO₂) de las ratas Wistar-UIS. Para esto se compararon los promedios de las variables fisiológicas obtenidas de tres momentos diferentes del experimento, basal (BAS), inmediatamente después de la inyección (PI) y a los 30 minutos de la misma (M30).

Los resultados de un ANOVA de una vía para cada variable por separado, indicó que en este experimento no se pudo evidenciar ningún cambio significativo de las variables fisiológicas asociadas a la inyección de Solución Salina. Los resultados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Resumen de las variables analizadas en el experimento con inyección de Solución Salina.

Variable	Valor de la prueba	Valor de p
FC	F [2,10]= 2.348	0.146
VO ₂	F [2,10]= 1.81	0.21
FR	F [2,10]= 1.549	0.25

FC, frecuencia cardiaca (ciclos/min.); FR, frecuencia respiratoria (ciclos/min.); VO₂, consumo de oxígeno en condiciones STPD (mL/Kg/min).

Los resultados del experimento se analizaron enfocándose en la respuesta a las siguientes preguntas:

Hay retorno a condiciones basales después de 30 minutos post-inyección de SS vía i.p. a las ratas o persiste algún cambio en las variables fisiológicas?: Se puede

concluir que no hubo diferencias significativas cuando se comparó los datos de estas variables fisiológicas a 30 minutos post-inyección con los registros basales; no hubo diferencias en la FC ($F [1,5] = 0.370$; $p = 0.56$), FR ($F [1,5] = 0.002$; $p = 0.96$) y VO₂ ($F [1,5] = 0.352$; $p = 0.11$).

Hay alguna diferencia cuando se compara la FC post-inyección con la FC 30 minutos después de aplicar la SS teniendo en cuenta su diferencia con el basal (PI – BAS vs. M30 – BAS)?: Para abordar esta pregunta se hizo una prueba t que mostró que a pesar de existir diferencias en el promedio de cada periodo comparados con su registro basal (diferencia= 28.8 vs. 5.43; pi-bas y m30-bas) no hubo diferencia estadísticamente significativa ($t = 1.403$ con 10 grados de libertad; $p = 0.191$) entre estos 2 momentos del experimento. También se hizo un ANOVA que no halló diferencias dependientes de cada etapa [$F 1,10 = 1.969$; $p = 0.191$].

Existe alguna correlación entre las variables evaluadas (FC, FR y VO₂) en el experimento que permitan construir algún modelo de interacción entre ellas?: Se hizo una correlación de Pearson encontrándose correlación únicamente entre el VO₂ y la FC después de la inyección (PI) de SS en donde ambas variables tienden a incrementarse juntas (coeficiente = 0.879; $p = 0.02$) y al realizar un análisis de regresión lineal se confirmó la correlación [VO₂ PI = $-31.669 + (0.130 * FC PI)$; R^2 ajustado = 0.716] [$F [1,4] = 13.594$; $p = 0.021$].

7.4. RESULTADOS EXPERIMENTO NÚMERO TRES, ETAPA 1.

Este experimento se realizó con la finalidad de evaluar los efectos de la inyección i.p de diferentes dosis de Adrenalina (AD) en las variables fisiológicas: frecuencia cardiaca (FC), frecuencia respiratoria (FR) y consumo de oxígeno (VO₂) medidos en diferentes periodos (BAS, basal; PI, post-inyección; M30, 30 minutos después de la inyección).

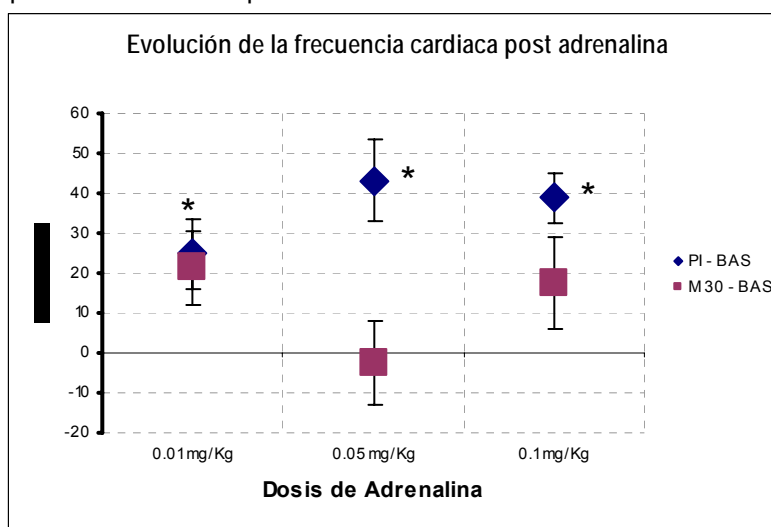
Comparación de la FC para cada una de los periodos y tratamientos: Tomando en consideración que se trabajó con una tamaño de muestra pequeño para efectos de obtener una orientación sobre la dosis que debería utilizarse con los animales expuestos al laberinto, en esta oportunidad se comparó mediante pruebas t pareadas el valor de la FC post-inyección menos la FC basal y la FC al minuto 30 menos la basal para cada dosis evaluada. Los resultados se muestran en la Tabla 11 y en la Figura 12.

Tabla 11. Valores de prueba “t” pareada y de “p” para las diferencias de la frecuencia cardiaca.

DOSIS	PI-BAS		M30-BAS	
	t	p	t	p
0.01	2.85	0.046	2.3	0.08
0.05	4.2	0.014	0.24	0.82
0.1	6.178	0.003	1.52	0.2

PI-BAS, post-inyección menos basal; **M30-BAS**, minuto 30 post-inyección menos basal; dosis en mg/Kg. en un volumen de 1 mL/Kg.; t, valor de prueba; p, valor de probabilidad.

Figura 12. Diferencias pareadas de la FC durante los períodos post inyección (PI) y minuto 30 (M30) con respecto a la FC basal para cada dosis de adrenalina evaluada.



*, $p < 0.05$; **PI-BAS**, post-inyección menos basal; **M30-BAS**, minuto 30 post-inyección menos basal.

Comparación de la FR para cada una de los periodos y tratamientos:

Se hizo con la frecuencia respiratoria un análisis semejante al realizado con FC, los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Valores de prueba “t” pareada y de “p” para las diferencias de la frecuencia respiratoria.

DOSIS	PI-BAS		M30-BAS	
	t	p	t	p
0.01	7.894	0.001	8.629	<.001
0.05	3.91	0.017	4.67	0.009
0.1	6.827	0.002	1.62	0.183

PI-BAS, post-inyección menos basal; **M30-BAS**, minuto 30 post-inyección menos basal; dosis en mg/Kg. en un volumen de 1 mL/Kg.; t, valor de prueba; p, valor de probabilidad.

Comparación del VO2 para cada una de los periodos y tratamientos: Se hizo un análisis similar al realizado con la FC, se comparó mediante pruebas t pareadas el valor del VO2 post-inyección menos el VO2 basal y el VO2 al minuto 30 menos el VO2 basal para cada dosis evaluada. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores de prueba “t” pareada y de “p” para las diferencias del consumo de oxígeno.

DOSIS	PI-BAS		M30-BAS	
	t	p	t	p
0.01	3.2	0.033	3.508	0.025
0.05	1.658	0.17	0.492	0.648
0.1	1.649	0.17	2.45	0.07

PI-BAS, post-inyección menos basal; **M30-BAS**, minuto 30 post-inyección menos basal; dosis en mg/Kg. en un volumen de 1 mL/Kg.; t, valor de prueba; p, valor de probabilidad.

7.5. RESULTADOS EXPERIMENTO NUMERO TRES, ETAPA 2.

Tal como se ha mencionado, este experimento se realizó en 2 etapas, la primera consistió en la exploración de varias dosis de AD y sus efectos sobre las variables fisiológicas y para la segunda etapa se seleccionó la dosis de AD considerada como la más adecuada de la etapa 1, es decir, la dosis de 0,1 mg/Kg porque fue la que mostró efecto significativo no debido al azar en relación al promedio de la FC y la FR al momento después de haberla inyectado y que mantuvo dicho aumento de la FC 30 minutos después de haber sido inyectada a diferencia de las otras dosis que no generaron incrementos (0,01 mg/Kg) de la FC o si lo hicieron el efecto no fue sostenido (0,05 mg/Kg).

Para la segunda etapa del experimento se aplicó la dosis elegida de AD o de SS 10 minutos antes de someter a las ratas a la prueba del laberinto, allí se les permitió la exploración libre por 5 minutos y al terminar fueron retirados y se les midieron las variables fisiológicas. Tres días después fueron sometidas por segunda vez al laberinto pero 10 minutos antes se les había inyectado SS vía i.p. en la dosis estándar de los experimentos.

Resultados del análisis de las variables fisiológicas en ratas sometidas al LCE a las que se les aplicó AD 0.1 mg/kg. Comparadas con las que se les aplicó SS.

Se hizo un ANOVA de dos vías (Tratamiento, TTO y Período, PDO) sobre las variables: FC, FR, VO2. Se hallaron diferencias significativas atribuibles a los

factores para algunas las variables analizadas Tabla 14, para todos los ANOVA que tuvieron diferencias significativas se hizo una prueba de Bonferroni *post hoc* para las comparaciones múltiples corregidas ($p < 0.05$). En ningún caso se encontraron interacciones significativas entre los factores.

Tabla 14. Resultados significativos de ANOVA de 2 vías (período y tratamiento) para cada una de las variables fisiológicas.

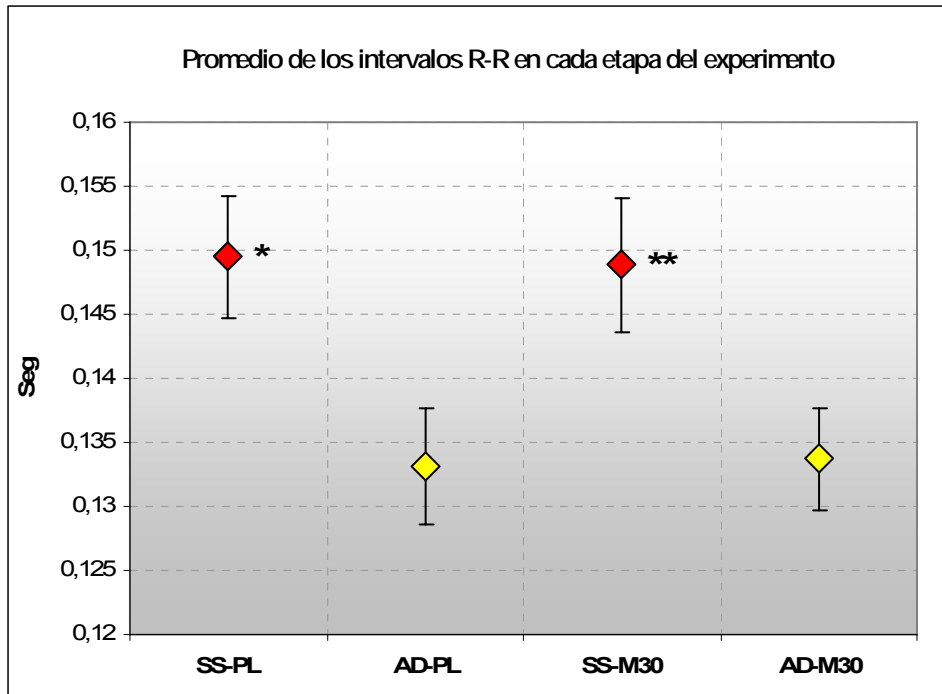
Ítem	Factor	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
FC	TTO	F [1,36] = 11.316	0.002	AD > SS
FR	PDO	F [1,36] = 5.818	0.021	PL > M30
FR	TTO	F [1,36] = 10.824	0.002	AD > SS
VO2	PDO	F [1,36] = 5.13	0.03	PL > M30

FC = frecuencia cardiaca; FR = frecuencia respiratoria; VO2 = consumo de oxígeno; TTO= tratamiento; PDO= período; AD= adrenalina; SS= solución salina. PL=Post-Laberinto; M30= Minuto 30 después de la inyección intraperitoneal; AD= Adrenalina (0.1 mg/kg); SS=Solución salina (0.9% p/v).

Resultados del análisis de electrocardiografía en ratas sometidas al LCE con AD 0.1 mg/kg comparadas con ratas a las que se les aplicó SS.

Comparación de los promedios de los intervalos R-R de ambos grupos sometidos al LCE: Se hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y PDO) que encontró diferencias significativas entre los promedios de los intervalos RR atribuibles al tratamiento farmacológico (F [1,36] = 11.572; $p = 0.002$) pero no se encontraron diferencias significativas atribuibles al factor “período” ni se encontraron interacciones significativas. Una prueba de Bonferroni *post hoc* confirmó que el promedio de intervalos R-R era mayor en el grupo de SS que en AD ($t = 3.402$; $p < 0.05$). Considerando que el poder de prueba de este ANOVA de dos factores fue pequeño (0.1), se procedió a comparar los intervalos R-R entre tratamientos para cada etapa por separado. Separando ambos grupos en una misma etapa del experimento, post-S1 del LCE y M30 post inyección (**PL** y **M30** respectivamente), una prueba t mostró diferencias significativas siendo mayores los intervalos en SS que en AD ($t = 2.47$; $p = 0.024$) en la etapa PL; así mismo, cuando se compararon ambos tratamientos 30 minutos después de la inyección una prueba t encontró diferencias siendo $SS > AD$ ($t = 2.34$; $p = 0.031$), (Figura 13).

Figura 13. Promedio de los intervalos R-R \pm EEM de los diferentes grupos y etapas del experimento.



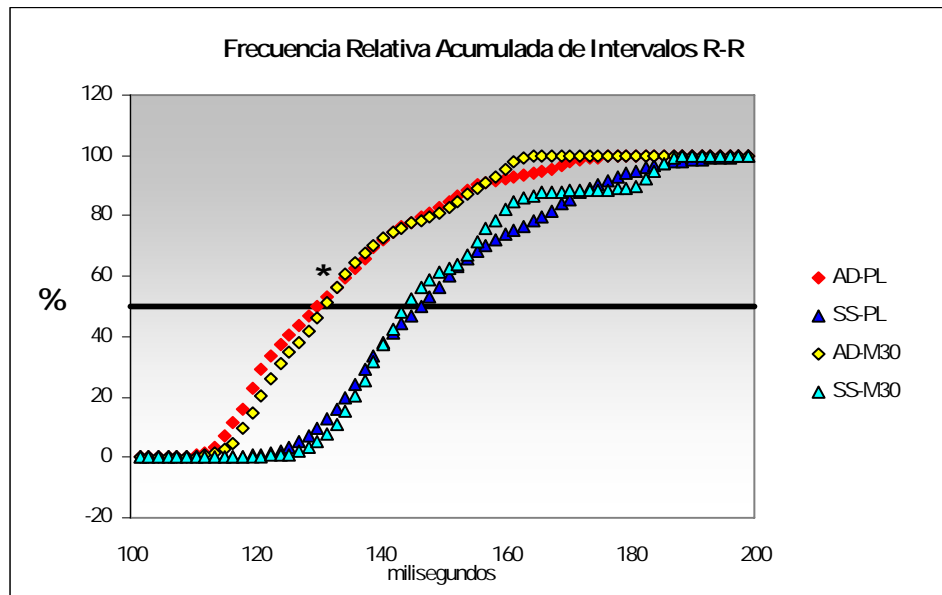
SS= solución salina; AD= adrenalina; PL= post LCE; M30= minuto 30. *, Promedio de los intervalos del grupo SS mayor que AD después de S1 en el LCE ($t = 2.47$, $p = 0.024$). **, Promedio de intervalos mayor para SS que AD en M30 ($t = 2.34$; $p = 0.031$).

Comparación de la mediana de los intervalos entre los grupos sometidos al LCE:

Tomando en consideración de que la mediana de los intervalos R-R se constituye en el valor que divide la muestra de intervalos en frecuencias acumuladas del 50% (Figuras 14 y 15) y que este sería un buen parámetro para identificar la tendencia del efecto global de los fármacos sobre la FC, se estimó este valor para cada animal y se hizo un ANOVA de dos vías (TTO y PDO) sobre los promedios de las medianas de los intervalos R-R. Se encontraron diferencias significativas atribuibles a TTO ($F [1,36] = 11.189$; $p = 0.002$) confirmado por análisis de Bonferroni *post hoc* donde se halló que las medianas de los animales tratados con SS fue mayor que las de los animales tratados con AD ($t = 3.345$; $p < 0.05$), (Figura 14).

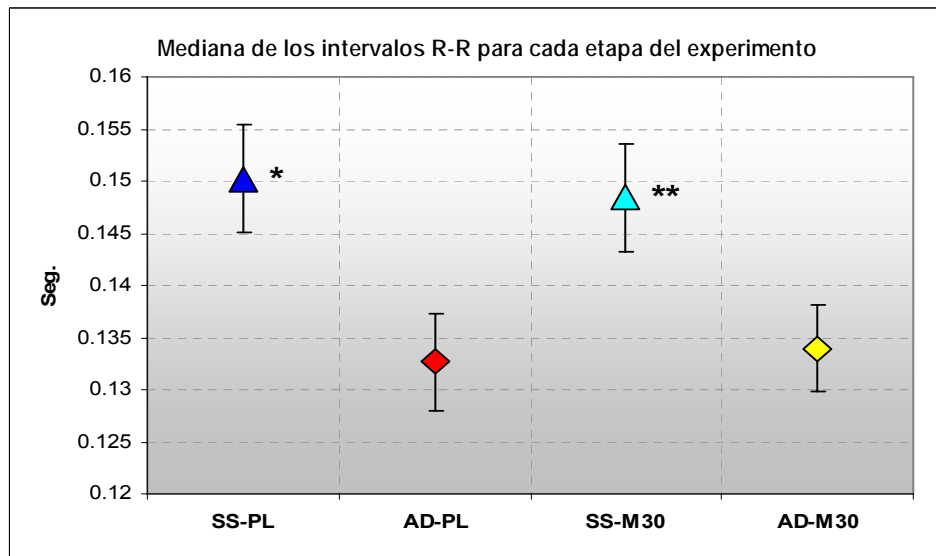
Cuando se quiso comparar la mediana de los intervalos R-R de cada fármaco administrado dentro de un mismo periodo experimental se hicieron pruebas t que hallaron diferencias significativas entre las medianas de los dos tratamientos farmacológicos dentro del período PL siendo SS > AD ($t = 2.527$; $p = 0.021$) y en M30 siendo SS > AD ($t = 2.196$; $p = 0.041$), (Figura 15).

Figura 14. Comparación de la frecuencia relativa acumulada de los distintos intervalos R-R entre los 2 grupos de tratamientos.



*, Promedio de las medianas de los intervalos AD < promedio de las medianas de los intervalos SS (ANOVA dos vías, $p = .002$). Note que el punto de corte en 50% corresponde a los análisis descritos en el texto acerca de los promedios de las medianas.

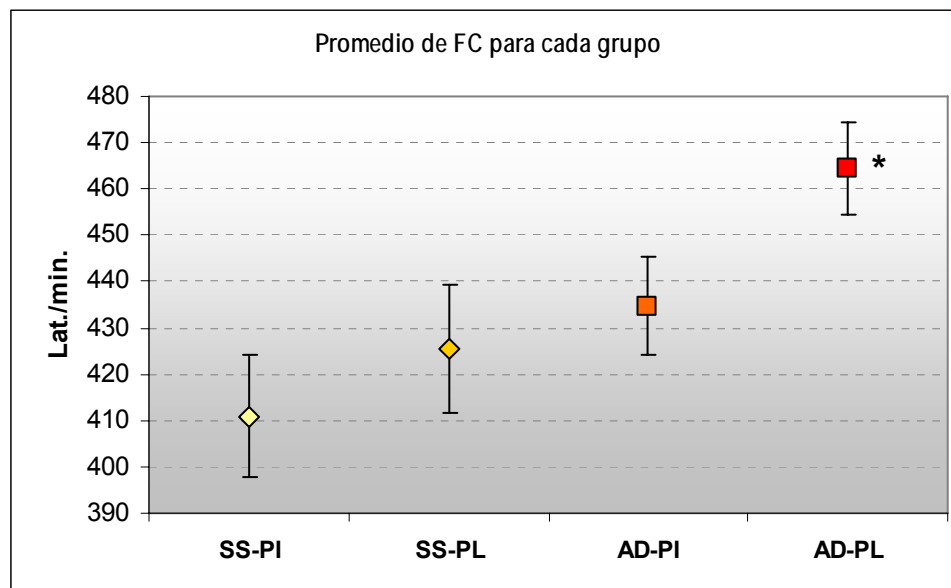
Figura 15. Comparación de la mediana de los intervalos R-R dentro de cada periodo experimental.



SS= solución salina; AD= adrenalina; PL= post LCE; M30= minuto 30. *, Mediana de los intervalos R-R es SS > AD en el periodo PL ($t = 2.527$; $p = 0.021$); **, Mediana de los intervalos R-R es SS > AD en el periodo M30 ($t = 2.196$; $p = 0.041$).

Comparación de la FC entre diferentes etapas del experimento (PI y PL) y los diferentes fármacos utilizados (AD y SS): De frente al hecho que en los experimentos previos en los que se evaluó el efecto de la inyección intraperitoneal de SS en ratas que no fueron sometidas al LCE no pudo obtenerse un registro físico o digital del EKG que permitiera hacer el análisis del promedio de los intervalos R-R y sus medidas derivadas como la mediana y las de análisis de variabilidad, se encontró que la comparación del promedio de la FC entre los grupos era la única opción para evaluar el efecto de la exposición al LCE en la FC de ratas a las que les inyectó SS con las que no fueron expuestas al LCE (grupo control) y también para poder comparar las que fueron inyectadas con Adrenalina y fueron expuestas o no al LCE. Se hizo un ANOVA de dos factores (TTO y PDO) sobre el promedio de FC, se hallaron diferencias significativas dependientes de interacciones ($F [3,30] = 3.794$; $p = 0.022$). Una prueba Bonferroni *post hoc* encontró a Adrenalina en post-LCE > SS en post-inyección ($t = 3.054$, $p < 0.05$). No hubo diferencias entre PI vs. PL en AD ($p > 0.05$), (Figura 16).

Figura 16. Promedio \pm EEM de la FC para las diferentes etapas y sustancias administradas a las ratas.

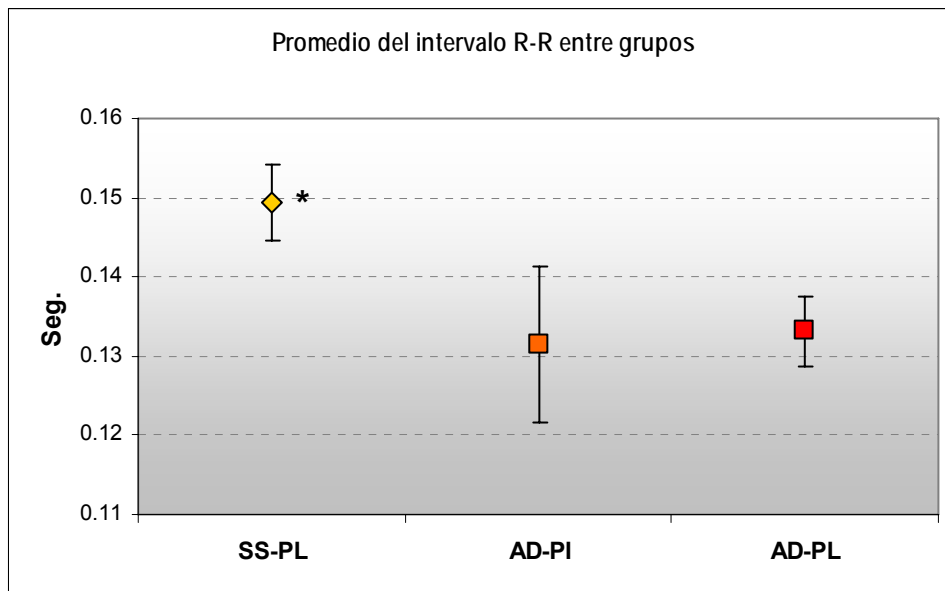


SS= Solución Salina, AD= Adrenalina, PI= post-inyección, PL= post-LCE. *, Promedio de la frecuencia cardiaca en AD-PL > promedio de la frecuencia cardiaca SS-PI (ANOVA, $p = 0.022$).

Comparación del promedio de los intervalos R-R entre diferentes etapas del experimento (PI y PL) y los diferentes fármacos utilizados (AD y SS): Ante la inexistencia de un registro electrocardiográfico posterior a la inyección de SS sin pasar por el LCE no se pudo establecer alguna comparación con los demás grupos dentro de este análisis. Con el propósito de valorar si el LCE ejercía en efecto acelerador de la FC *per se*, se eligió la comparación del promedio de los

intervalos R-R del grupo al que se inyectó SS (SS-PL) y se expuso al LCE con los intervalos R-R de los grupos que recibieron adrenalina y no fueron expuestos al laberinto (AD-PI) o que recibieron adrenalina y fueron expuestos al LCE (AD-PL).; para esto se hizo un ANOVA de una vía (GRUPO) sobre el promedio de los intervalos R-R, se hallaron diferencias significativas dependientes de GRUPO ($F [2,42] = 6.18$; $p = 0.004$); una prueba Bonferroni *post hoc* encontró que el promedio de los intervalos R-R del grupo SS-PL fue mayor que el del grupo AD-PL ($t = 3.282$, $p < 0.05$), (Figura 17).

Figura 17. Promedio \pm EEM de los intervalos R-R para las diferentes etapas y sustancias administradas a las ratas.



SS= Solución Salina, AD= Adrenalina, PI= post-inyección, PL= post-LCE. *, Promedio de los intervalos R-R fue mayor en SS en el periodo PI que el promedio de los intervalos R-R para AD en el periodo PL (ANOVA, $p = 0.022$).

Comparación de la FR entre diferentes etapas del experimento y los diferentes fármacos utilizados: Se hizo un ANOVA de dos vías (TTO y Etapa) sobre el promedio de FR entre los diferentes TTO con y sin exposición al LCE, no se hallaron diferencias significativas ($p > 0.05$) atribuibles a alguno de los factores ni a las interacciones entre ellos.

Comparación del VO2 entre diferentes etapas del experimento y los diferentes fármacos utilizados: Se hizo un ANOVA de dos vías (TTO y Etapa) sobre el promedio VO2 entre los diferentes TTO con y sin LCE, se hallaron diferencias significativas dependientes de cada factor y adicionalmente dependientes de interacciones. Estos resultados al igual que los de las comparaciones múltiples corregidas (Bonferroni) se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Valores de la prueba de comparaciones múltiples (Bonferroni) para el VO2.

Ítem	Factor	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
VO2	TTO	F [1,27] = 7.947	0.009	AD > SS
	Etapa	F [1,27] = 20.225	< 0.001	PL > PI
	TTO x Etapa	F [1,27] = 10.009	0.004	SS-PI > SS-PL
	TTO x Etapa	F [1,27] = 10.009	0.004	SS-PI > AD-PI

SS= Solución Salina, AD= Adrenalina, PI= post-inyección, PL= post-LCE.

Análisis de variabilidad de intervalos R-R en las ratas sometidas al LCE.

Comparación de la diferencia en los indicadores pNN5, 10, 15, 20 y 25 entre los dos grupos (valores Relativos): Se hizo un ANOVA de dos vías (TTO y PDO) teniendo como cada pNNx como variable dependiente y se hallaron diferencias significativas para algunas de ellas que se resumen en la Tabla 16, cuando los ANOVA indicaron diferencias significativas, se hizo una prueba de Bonferroni *post hoc* para las comparaciones múltiples corregidas ($p < 0.05$). En ningún caso se encontraron interacciones significativas entre los factores.

Tabla 16. Resultados del análisis de los pNNx (ANOVA de dos vías).

Ítem	Factor	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
pNN5	PDO	F [1,36] = 5.847	0.021	PL > M30
pNN10	PDO	F [1,36] = 4.852	0.034	PL > M30
pNN10	TTO	F [1,36] = 5.123	0.03	SS > AD
pNN15	PDO	F [1,36] = 4.68	0.037	PL > M30
pNN15	TTO	F [1,36] = 4.23	0.047	SS > AD
pNN20	-	-	>0.05	-
pNN25	-	-	>0.05	-

SS= Solución Salina; AD= Adrenalina; PI= post-inyección; PL= post-LCE; M30= minuto 30 posterior a la inyección.

Comparación del RMSSD entre los grupos: Se hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y PDO) sobre el RMSSD como variable dependiente, se halló diferencia significativa entre los grupos atribuibles al TTO (F [1,36] = 4.142; $p = 0.049$), una prueba de Bonferroni *post hoc* para las comparaciones múltiples encontró diferencias siendo el RMSSD mayor en el grupo que se le inyectó SS que en el que se le inyectó AD ($t = 2.035$; $p < 0.05$).

Comparación del porcentaje de %nPOS y %NEG: Estos indicadores se refieren a la ocurrencia de 2 despolarizaciones ventriculares (ondas R) del corazón de la rata y al intervalo de tiempo que existe entre estos 2 eventos; cuando ocurre una desaceleración inmediata de un intervalo respecto al anterior se produce una diferencia positiva y cuando ocurre una aceleración inmediata se produce una diferencia negativa.

El indicador **%nPOS** se refiere al valor relativo de intervalos RR adyacentes que tienen una diferencia mayor que su intervalo precedente dentro de todo el conjunto de intervalos R-R del registro; al contrario, el **%nNEG** se refiere al valor relativo de intervalos RR adyacentes que tienen una diferencia menor que su intervalo precedente. Para el grupo tratado con SS el análisis de T pareada entre PL y M30 mostró diferencias significativas para el %nPOS [PL > M30 (t = 2.724; p = 0.026)] y para el %nNEG encontró también diferencias significativas [PL < M30 (t = 2.677; p = 0.028)]. Para el grupo tratado con AD no hubo diferencias significativas entre los valores. No obstante, por existir un bajo poder de la prueba se procedió a separar los datos por TTO y se hallaron diferencias significativas que se resumen en la Tabla 17.

Tabla 17. Comparaciones de los %nNEG y %nPOS entre Tratamiento y Periodo.

Ítem	Factor	Resultado	Valor de la prueba	Valor de p
%nPOS	TTO	SS > AD	t= 2.780 [18 gl]	0.012
%nNEG	TTO	SS > AD	t= 2.782 [18 gl]	0.012
%nPOS	PDO	PL > M30	T pareada = 2.724 [8 gl]	0.026
%nNEG	PDO	PL < M30	T pareada = 2.677 [8 gl]	0.028

SS= Solución Salina; AD= Adrenalina; M30= minuto 30 posterior a la inyección; PL= post-LCE; gl= grados de libertad.

Comparación entre Máximo intervalo R-R y Mínimo intervalo R-R entre los grupos de tratamiento: Un ANOVA de dos vías (TTO y PDO) sobre la duración del máximo intervalo encontró diferencia significativa dependiente de TTO (F [1,36] = 6.191; p = 0.018) se hizo una prueba Bonferroni *post hoc* que halló SS > AD (t = 2.488; p < 0.05) indicando que los mayores intervalos se registraron en el grupo de SS. Cuando se cambió la variable dependiente para evaluar la duración del mínimo intervalo hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y PDO) que encontró diferencias significativas dependientes de TTO (F [1,36] = 5.458; p = 0.025) y una prueba Bonferroni *post hoc* encontró a SS > AD (t = 2.336; p < 0.05) indicando que los menores intervalos se registraron en el grupo de AD.

De una manera global, los resultados apuntan que en todos los parámetros indicadores de variabilidad R-R los animales tratados con AD presentan una menor variabilidad de tales intervalos que los tratados con SS. Adicionalmente, la variabilidad disminuye a los 30 minutos post-inyección.

Resultados del análisis de comportamiento en el LCE

Comparación de la actividad motora de las ratas sometidas al LCE: Se hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y SES) (**SES**= sesión) para evaluar el parámetro de CRUZAMIENTOS (Número de cambios de los lugares virtuales en que se dividió

el LCE al momento de realizar los registros. Ver materiales y métodos) del LCE entre los grupos y no se hallaron diferencias, es decir, las ratas tuvieron comportamiento exploratorio similar independiente del fármaco y la sesión.

Comparación del Tiempo en el Brazo Abierto (TBA) para cada sesión (SES) y tratamiento en ratas sometidas al LCE: Se hizo un ANOVA 2 vías (TTO y SES) que encontró diferencias significativas dependientes de interacciones ($F [1,36] = 5.357$; $p = .026$) en donde la prueba de Bonferroni *post hoc* presentó los resultados que se ilustran en la Tabla 18.

Tabla 18. Comparación de TTO y SES en relación al TBA.

Factores	Item	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
PDO en SS	TBA	t= 2.362	< 0.05	S1 > S2
TTO en S1	TBA	t= 2.631	< 0.05	SS > AD
PDO en AD	TBA	t = 0.84	> 0.05	
TTO en S2	TBA	t= 0.642	> 0.05	

PDO, periodo; TTO, tratamiento; TBA, tiempo en brazos abiertos (valor absoluto); S1, sesión 1; S2, sesión 2; SS, solución salina; AD, adrenalina.

Para la **evaluación de los tiempos relativos en el brazo abierto (%TBA)** se hizo un ANOVA de 2 vías no paramétrico (TTO y SES) comparando el porcentaje de tiempo dentro del brazo abierto con relación a la suma de los tiempos de permanencia en cualquiera de los brazos (se excluye el tiempo en el centro del LCE) se hallaron diferencias significativas dependientes de interacciones ($F [1,36] = 5.358$; $p = 0.026$); se hizo una prueba Bonferroni *post hoc* que se resume en la Tabla 19.

Tabla 19. Comparación de TTO y SES en relación al %TBA.

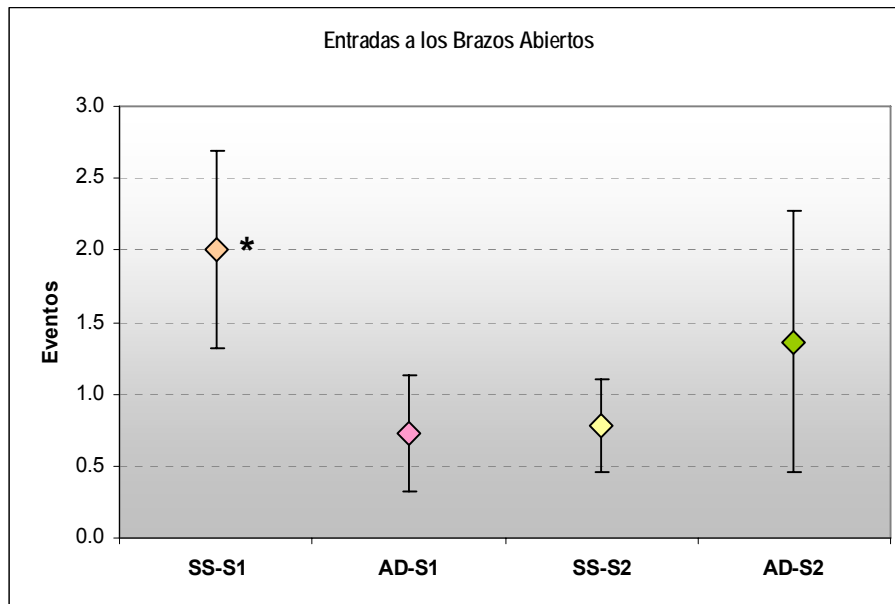
Factores	Item	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
PDO en SS	%TBA	t= 2.362	< 0.05	S1 > S2
TTO en S1	%TBA	t= 2.631	< 0.05	SS > AD
PDO en AD	%TBA	t = 0.84	> 0.05	
TTO en S2	%TBA	t= 0.642	> 0.05	

PDO, periodo; TTO, tratamiento; %TBA, tiempo en brazos abiertos (valor relativo); S1, sesión 1; S2, sesión 2; SS, solución salina; AD, adrenalina.

Comparación de las Entradas en el Brazo Abierto (EBA) para cada sesión y tratamiento en ratas sometidas al LCE: Se hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y SES) para comparar las EBA entre los diferentes grupos de ratas pero no se encontraron diferencias significativas, a pesar de que hubo un poder bajo en la

prueba ($1-\alpha = .15$). Por tal motivo, se procedió a comparar las EBA a través de un ANOVA de 2 vías (SES y LUGAR) para cada TTO y se encontró para el grupo de SS que hubo diferencias por SES ($F [1,48] = 6.415$; $p = 0.015$) con análisis separado por prueba de Bonferroni *post hoc* $S1 > S2$ ($t = 2.533$; $p < 0.05$) y por LUGAR ($F [1,48] = 3.374$; $p = 0.043$) con análisis separado por prueba de Bonferroni *post hoc* que encontró $L5 > L7$ ($t = 2.574$; $p < 0.05$). Para el grupo de AD no hubo diferencias significativas (Figuras 18 y 19).

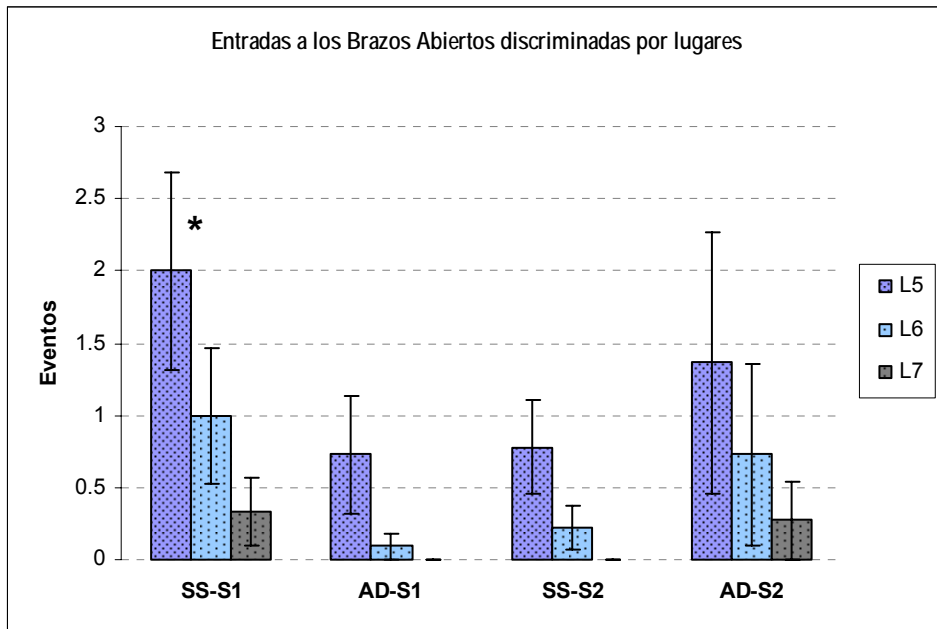
Figura 18. Promedio \pm EEM de EBA para los diferentes tratamientos y sesiones.



PDO, periodo; TTO, tratamiento; S1, sesión 1; S2, sesión 2; SS, solución salina; AD, adrenalina. *, Número de entradas en S1 > S2 para el grupo de SS (ANOVA, $p = 0.015$).

Para la **evaluación de las entradas relativas en el brazo abierto (%EBA)** se hizo un ANOVA de 2 vías (SES y LUGAR) para cada TTO y se encontró para el grupo de SS que hubo diferencias por SES ($F [1,48] = 6.415$; $p = 0.015$) con análisis separado por prueba de Bonferroni *post hoc* $S1 > S2$ ($t = 2.533$; $p < .05$) y por LUGAR ($F [1,48] = 3.374$; $p = 0.043$) con análisis separado por prueba de Bonferroni *post hoc* que encontró $L5 > L7$ ($t = 2.574$; $p < 0.05$). Para el grupo de AD no se hallaron diferencias significativas aunque el valor de la prueba se ubicó en un valor limítrofe ($F [1,48] = 3.144$; $p = 0.05$) pero con un poder bajo ($1-\alpha = 0.41$).

Figura 19. Promedio \pm EEM de EBA para los diferentes tratamientos y sesiones discriminado por lugares.



PDO, periodo; TTO, tratamiento; S1, sesión 1; S2, sesión 2; SS, solución salina; AD, adrenalina. *, Número de entradas en L5 > L7 para el grupo de SS en ambas sesiones (ANOVA, $p = 0.043$).

7.6. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO NÚMERO 4

Análisis de las variables fisiológicas

Este experimento se desarrolló en 2 etapas, la primera tuvo la intención de evaluar el efecto de distintas combinaciones de fármacos (atenolol, midazolam y salina) sobre las variables fisiológicas de las ratas Wistar UIS y se realizaron registros de la frecuencia cardíaca (FC), frecuencia respiratoria (FR) y consumo de oxígeno (VO₂); la segunda etapa se encaminó a evaluar el efecto de las mismas combinaciones farmacológicas sobre el comportamiento en el laberinto en cruz elevado (LCE) así como sobre las variables fisiológicas registradas (FC, FR y VO₂) justo después de someter las ratas a la prueba del LCE. La decisión de las dosis de cada sustancia a aplicar se fundamentó en datos de experimentos previos fundamentados en la literatura científica disponible y en ensayos de evaluación realizados dentro del proceso de estandarización de la técnica del experimento.

Efecto de las distintas asociaciones farmacológicas sobre la FC en ratas sometidas al LCE y no sometidas al LCE: Se hizo un ANOVA de 2 vías

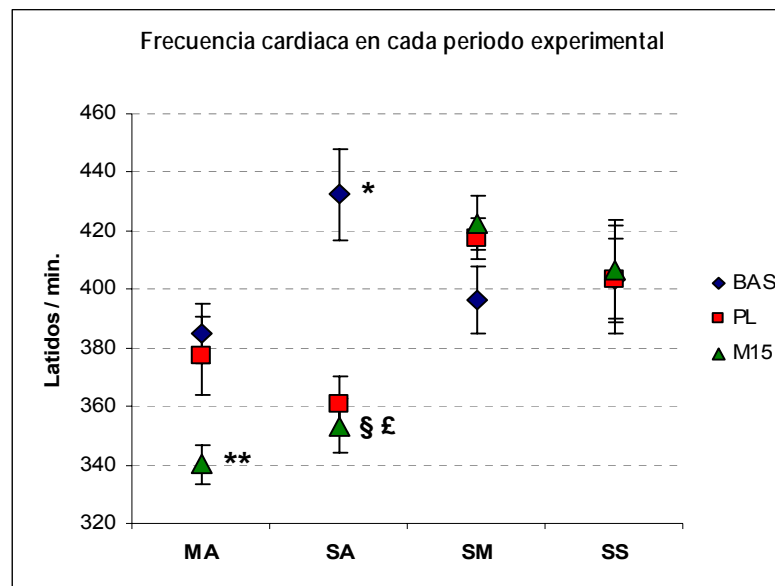
(tratamiento, TTO y periodo, PDO) sobre la FC en las distintas mediciones que se hicieron en las 2 etapas experimentales y se hallaron diferencias significativas atribuibles a TTO y PDO, así mismo se detectaron diferencias significativas debidas a interacciones. Se hizo un análisis de Bonferroni *post hoc* para las comparaciones múltiples que resultaron significativas. Los resultados significativos se resumen en la Tabla 20 y se presentan en la Figura 20.

Tabla 20. Diferencias significativas en la frecuencia cardiaca entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.

Item	Factor	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
FC	TTO	F [3,72] = 8.033	< 0.001	SS > MA; SM > MA y SA
	PDO	F [2,72] = 3.263	0.044	BAS > M15
	PDO en SA	F [6,72] = 4.195	0.001	BAS > PL y M15
	TTO en M15	F [6,72] = 4.195	0.001	MA < SS y SM; SA < SS y SM
	TTO en PL	F [6,72] = 4.195	0.001	SA < SM y SS

SS, solución salina; MA, midazolam + atenolol; SM, solución salina + midazolam; SA, solución salina + atenolol; BAS, basal; PL, post-LCE; M15, minuto 15 post-inyección.

Figura 20. Promedio \pm EEM de la frecuencia cardiaca entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.



SS, solución salina; MA, midazolam + atenolol; SM, solución salina + midazolam; SA, solución salina + atenolol; BAS, basal; PL, post LCE; M15, minuto 15 post-inyección. *, Frecuencia cardiaca en periodo BAS > PL y M15 en el grupo SA. **, Frecuencia cardiaca en el grupo MA < SS y SM el periodo M15. £, Frecuencia cardiaca en el grupo SA < SM y SS en el periodo PL. §, Frecuencia cardiaca en el grupo SA < SM y SS en el periodo M15. (ANOVA de 2 vías, $p < 0.05$).

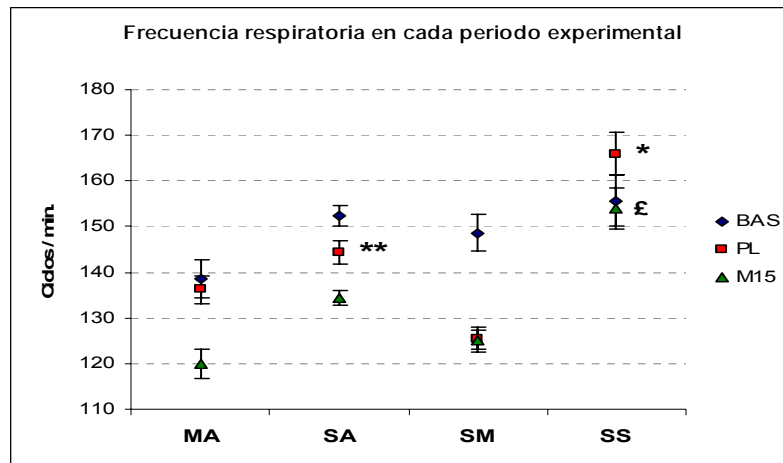
Efecto de las distintas asociaciones farmacológicas sobre la FR en ratas sometidas al LCE y no sometidas al LCE: Se hizo un ANOVA de 2 vías (tratamiento, TTO y periodo, PDO) sobre la FR en las distintas mediciones que se hicieron en las 2 etapas experimentales y se hallaron diferencias significativas en TTO y PDO, así mismo se detectaron diferencias significativas debidas a interacciones. Se hizo un análisis de Bonferroni *post hoc* para las comparaciones múltiples que resultaron significativas. Los resultados significativos se resumen en la Tabla 21 y se presentan en la Figura 21.

Tabla 21. Diferencias significativas en la frecuencia respiratoria entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.

Item	Factor	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
FR	TTO	F [3,72] = 35.786	< 0.001	SS > SA, MA y SM; SA > MA y SM
	PDO	F [2,72] = 16.93	< 0.001	M15 < PL y BAS
	PDO en MA	F [6,72] = 4.359	< 0.001	M15 < PL y BAS
	PDO en SA	F [6,72] = 4.359	< 0.001	M15 < BAS
	PDO en SM	F [6,72] = 4.359	< 0.001	BAS > PL y M15
	TTO en BAS	F [6,72] = 4.359	< 0.001	SS > MA
	TTO en M15	F [6,72] = 4.359	< 0.001	SS > SA, MA y SM
	TTO en PL	F [6,72] = 4.359	< 0.001	SS > SA, MA y SM; SA > SM

SS, solución salina; MA, midazolam + atenolol; SM, solución salina + midazolam; SA, solución salina + atenolol; BAS, basal; PL, post-LCE; M15, minuto 15 post-inyección.

Figura 21. Promedio \pm EEM de la frecuencia respiratoria entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.



SS, solución salina; MA, midazolam + atenolol; SM, solución salina + midazolam; SA, solución salina + atenolol; BAS, basal; PL, post-LCE; M15, minuto 15 post-inyección. *, Frecuencia respiratoria en el grupo SS > SA, MA y SM en el periodo PL. **, Frecuencia respiratoria en el grupo SA > SM en el periodo PL. £, Frecuencia respiratoria en el grupo SS > SA, MA y SM en el periodo M15. (ANOVA de 2 vías, $p < 0.001$).

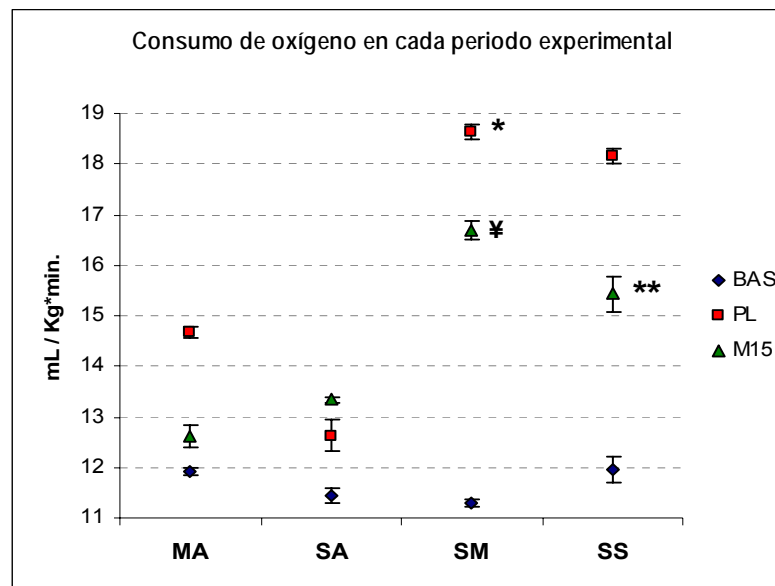
Efecto de las distintas asociaciones farmacológicas sobre el VO₂ en ratas sometidas al LCE y no sometidas al LCE: Se hizo un ANOVA de 2 vías (tratamiento, TTO y periodo, PDO) sobre el VO₂ en las distintas mediciones que se hicieron en las 2 etapas experimentales y se hallaron diferencias significativas en TTO y PDO, así mismo se detectaron diferencias significativas debidas a interacciones. Se hizo un análisis de Bonferroni *post hoc* para las comparaciones múltiples que resultaron significativas. Los resultados significativos se resumen en la Tabla 22 y se presentan en la Figura 22.

Tabla 22. Diferencias significativas en el consumo de oxígeno entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.

Ítem	Factor	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
VO ₂	TTO	F [3,72] = 167.061	< 0.001	SS > SA y MA; SM > SA y MA; MA > SA
	PDO	F [2,72] = 488.452	< 0.001	BAS < PL y M15; PL > M15
	PDO en MA	F [6,72] = 60.835	< 0.001	PL > BAS y M15
	PDO en SA	F [6,72] = 60.835	< 0.001	BAS < PL y M15; PL < M15
	PDO en SM	F [6,72] = 60.835	< 0.001	BAS < PL y M15; PL > M15
	PDO en SS	F [6,72] = 60.835	< 0.001	BAS < PL y M15; PL > M15
	TTO en M15	F [6,72] = 60.835	< 0.001	SM > SA, MA y SS; SS > SA y MA
	TTO en PL	F [6,72] = 60.835	< 0.001	SS > SA y MA; SM > SA y MA; MA > SA

SS, solución salina; MA, midazolam + atenolol; SM, solución salina + midazolam; SA, solución salina + atenolol; BAS, basal; PL, post-LCE; M15, minuto 15 post-inyección.

Figura 22. Promedio ± EEM del consumo de oxígeno entre las diferentes etapas y periodos del experimento 4.



SS, solución salina; MA, midazolam + atenolol; SM, solución salina + midazolam; SA, solución salina + atenolol; BAS, basal; PL, post-LCE; M15, minuto 15 post-inyección. *, Consumo de oxígeno en el grupo SM > SA, MA y SS en el periodo PL. **, Consumo de oxígeno en el grupo SS > SA y MA en el periodo M15. ¥, Consumo de oxígeno en el grupo SM > SA y MA en el periodo M15. (ANOVA de 2 vías, p < 0.001).

Análisis de los registros electrocardiográficos.

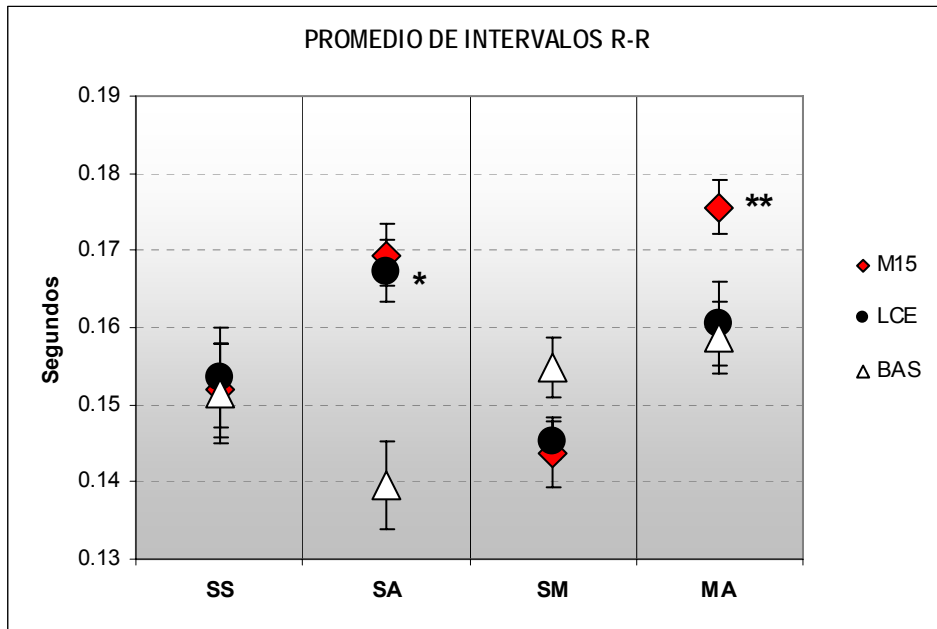
Evaluación del promedio de intervalos R-R entre los diferentes grupos de ratas sometidas al LCE comparado con las que no fueron sometidas al laberinto: Se hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y PDO) que encontró diferencias significativas dependientes de TTO e interacciones. Para todos los ANOVA que tuvieron diferencias significativas se realizó una prueba de Bonferroni *post hoc* para las comparaciones múltiples ($p < 0.05$). Los resultados se presentan en la Tabla 23 y Figura 23.

Tabla 23. Diferencias significativas en el promedio de los intervalos R-R para los grupos del experimento 4.

Ítem	Factor	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
Promedio Intervalo R-R	TTO	F [3,72] = 6.386	< 0.001	MA > SS y SM
	TTO en PL	F [6,72] = 3.912	0.002	SA > SM
	TTO en M15	F [6,72] = 3.912	0.002	MA > SS y SM; SA > SM

SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol; BAS, basal; PL, post-LCE; M15, minuto 15 post-inyección.

Figura 23. Promedio de los intervalos R-R para los grupos del experimento 4.



SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol; BAS, basal; PL, post-LCE; M15, minuto 15 post-inyección. *, Promedio de los intervalos R-R es mayor en SA que SM en los periodos PL y M15; **, Promedio de los intervalos R-R es mayor en MA que SS y SM en el periodo M15.

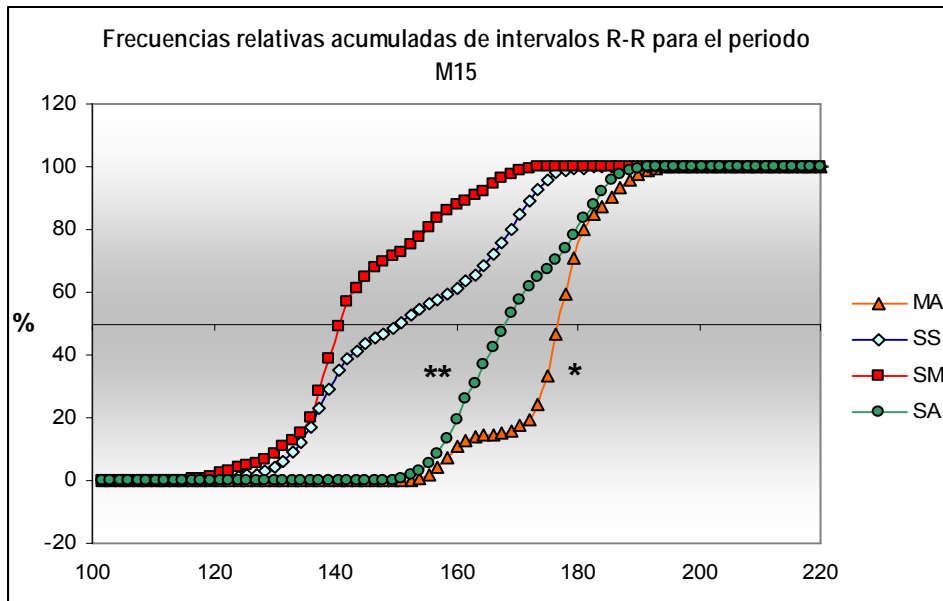
Evaluación del promedio de las medianas de los intervalos R-R entre los diferentes grupos de ratas sometidas al LCE comparado con las que no fueron sometidas al laberinto: Se hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y PDO) sobre la mediana de los intervalos R-R, entendiéndose esta medición como el valor que divide la muestra de intervalos en frecuencias acumuladas del 50% y que este sería un buen parámetro para identificar la tendencia del efecto global de los fármacos sobre la FC, se estimó este valor para cada animal. Se hallaron diferencias significativas dependientes de TTO e interacciones. Para todos los ANOVA que tuvieron diferencias significativas se realizó una prueba de Bonferroni *post hoc* para las comparaciones múltiples ($p < 0.05$). Los resultados se presentan en la Tabla 24 y en las Figuras 24 y 25.

Tabla 24. Diferencias significativas en la mediana de los intervalos R-R para cada grupo y periodo del experimento 4.

Ítem	Factor	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
Mediana Intervalo R-R	TTO	F [3,72] = 5.82	0.001	MA > SS y SM
	TTO en PL	F [6,72] = 4.129	0.001	SA > SM
	TTO en M15	F [6,72] = 4.129	0.001	MA > SS y SM; SA > SM

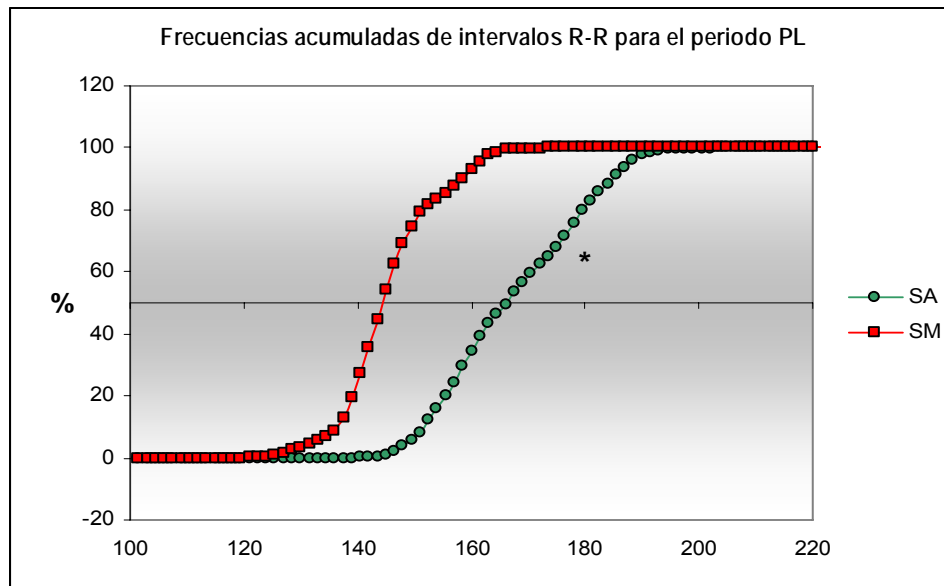
SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol; PL, post-LCE; M15, minuto 15 post-inyección.

Figura 24. Diferencias significativas en la frecuencia relativa acumulada de los distintos intervalos R-R entre los grupos de tratamiento durante el periodo de minuto 15 post-inyección.



SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol; *, Promedio de las medianas de los intervalos en el grupo MA es mayor que en los grupos SS y SM; **, Promedio de las medianas de los intervalos en el grupo SA es mayor que en el grupo SM. Note que el punto de corte en 50% corresponde a los análisis descritos en el texto acerca de los promedios de las medianas. (ANOVA 2 vías, $p = 0.001$)

Figura 25. Diferencias significativas en la frecuencia relativa acumulada de los distintos intervalos R-R entre los grupos de tratamiento durante el periodo post-laberinto en cruz elevado.



SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; *, Promedio de las medianas de los intervalos en el grupo SA es mayor que en el grupo SM. Note que el punto de corte en 50% corresponde a los análisis descritos en el texto acerca de los promedios de las medianas. (ANOVA 2 vías, $p = 0.001$)

Análisis de variabilidad de los intervalos R-R

Comparación del RMSSD entre los grupos: Se hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y PDO) sobre el RMSSD y se halló diferencia significativa entre los grupos atribuibles al PDO ($F [2,72] = 3.489$; $p = 0.036$), una prueba de Bonferroni *post hoc* para las comparaciones múltiples encontró que el RMSSD fue mayor en el periodo BAS que en M15 ($t = 2.59$; $p < 0.05$).

Comparación del porcentaje de %nPOS y %NEG: En la evaluación del %nPOS se hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y PDO) sobre esta variable y se encontraron diferencias significativas dependientes de PDO ($F [2,72] = 4.279$; $p = 0.018$) y TTO ($F [3,72] = 3.902$; $p = 0.012$); se hizo una prueba de Student-Newman-Keuls *post hoc* para las comparaciones múltiples que halló el %nPOS mayor en el periodo BAS que en M15 ($q = 4.132$; $p < 0.05$) y también halló el %nPOS menor en el grupo tratado con MA que en el grupo de SA ($q = 4.558$; $p < 0.05$) y que en el grupo de SS ($q = 3.956$; $p < 0.05$). A partir de estos hallazgos se concluye que en el periodo BAS hubo una tendencia a diferencias de intervalos R-R mayores a cero debido a la desaceleración entre los mismos comparados con los hallazgos del periodo M15; al contrario, en el grupo tratado con MA hubo menor proporción de diferencias mayores a cero lo cual indicaría una tendencia al acortamiento del

tiempo entre intervalos R-R adyacentes, es decir, a la aceleración de la frecuencia cardíaca cuando se le compara con los grupos tratados con SA y SM.

Para la evaluación del %nNEG se hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y PDO) sobre esta variable y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Comparación de la diferencia en los indicadores pNN5, 10, 15, 20 y 25 entre los dos grupos (valores Relativos): Se hizo un ANOVA de dos vías (TTO y PDO) teniendo como cada pNNx como variable dependiente y se hallaron diferencias significativas para algunas de ellas que se resumen en la Tabla 25; cuando los ANOVA indicaron diferencias significativas, se hizo una prueba de Student-Newman-Keuls *post hoc* para las comparaciones múltiples corregidas ($p < 0.05$). En ningún caso se encontraron interacciones significativas entre los factores.

Para los indicadores pNN5 y pNN25 no se hallaron diferencias significativas ($p > 0.05$); en el indicador pNN10 no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos pero hubo un valor limítrofe en el factor PDO ($p = 0.051$), no obstante el poder de la prueba estadística fue bajo ($1-\alpha = 0.408$) para dicho factor.

Tabla 25. Resultados del análisis de los pNNx del experimento 4 (ANOVA de dos vías).

Ítem	Factor	Valor de la prueba	Valor de p	S-N-K
pNN15	PDO	F [2,72] = 3.145	0.037	BAS > PL
pNN20	PDO	F [2,72] = 3.99	0.023	BAS > PI y PL

S-N-K, Student-Newman-Keuls; BAS, basal; PL, post-LCE; M15, minuto 15 post-inyección.

Evaluación del máximo y mínimo intervalo R-R entre los diferentes grupos de ratas sometidas al LCE comparado con las que no fueron sometidas al laberinto: Un ANOVA de dos vías (TTO y PDO) sobre la duración del máximo intervalo encontró diferencia significativa dependiente de interacciones (F [6,72] = 2.528; $p = 0.028$), para las comparaciones múltiples se hizo una prueba Bonferroni *post hoc* que halló MA > SM en el periodo M15 ($t = 2.732$; $p < 0.05$) indicando que los mayores intervalos se registraron en el grupo de Midazolam + Atenolol para dicho periodo; en los restantes grupos y periodos no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Cuando se cambió la variable dependiente por la duración del mínimo intervalo se hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y PDO) que encontró diferencias significativas dependientes de PDO, TTO y de interacciones; el resumen de los resultados para esta última variable se presenta en la Tabla 26.

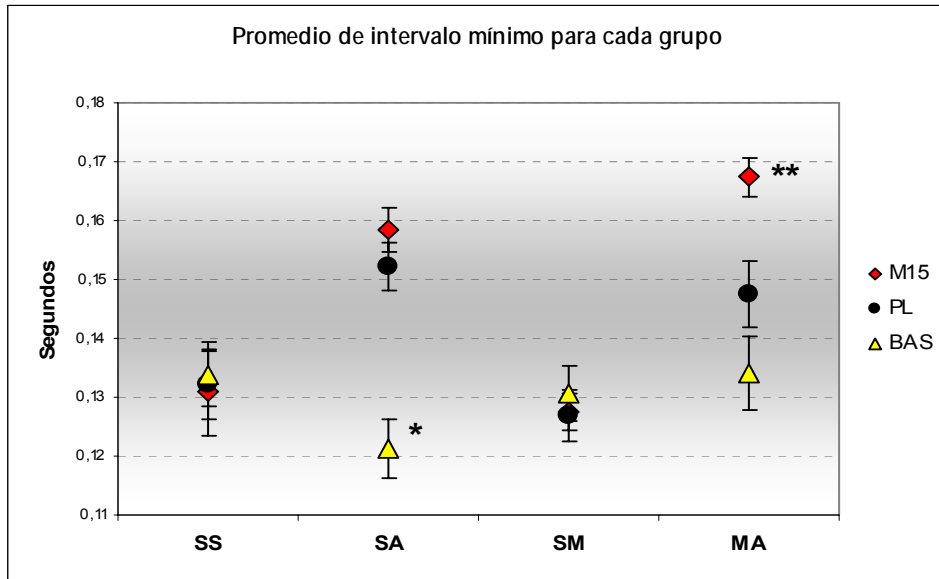
Tabla 26. Diferencias significativas en el promedio del mínimo intervalo R-R para cada grupo y periodo del experimento 4.

Item	Factor	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
Promedio del mínimo intervalo R-R	PDO	F [2,72] = 8.527	< 0.001	BAS < PL y PL
	TTO	F [3,72] = 10.742	< 0.001	MA > SS y SM; SA > SM
	TTO en PL	F [6,72] = 4.704	< 0.001	MA > SM; SA > SM y SS
	TTO en M15	F [6,72] = 4.704	< 0.001	MA > SS y SM; SA > SM y SS
	PDO en MA	F [6,72] = 4.704	< 0.001	M15 > BAS y PL
	PDO en SA	F [6,72] = 4.704	< 0.001	BAS < PL y PL

SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol; BAS, basal; PL, post-LCE; M15, minuto 15 post-inyección.

A partir de los resultados se concluye que en los grupos a los que se les inyectó Atenolol (SA y MA) tuvieron un promedio de mínimo intervalo de mayor duración respecto al basal, mientras que en el grupo tratado con SM y en el grupo tratado con SS el promedio de los mínimo intervalos R-R se mantuvo sin diferencias significativas respecto a la cifra basal (Figura 26).

Figura 26. Diferencias significativas en el promedio del intervalo mínimo para cada uno de los grupos del experimento 4.



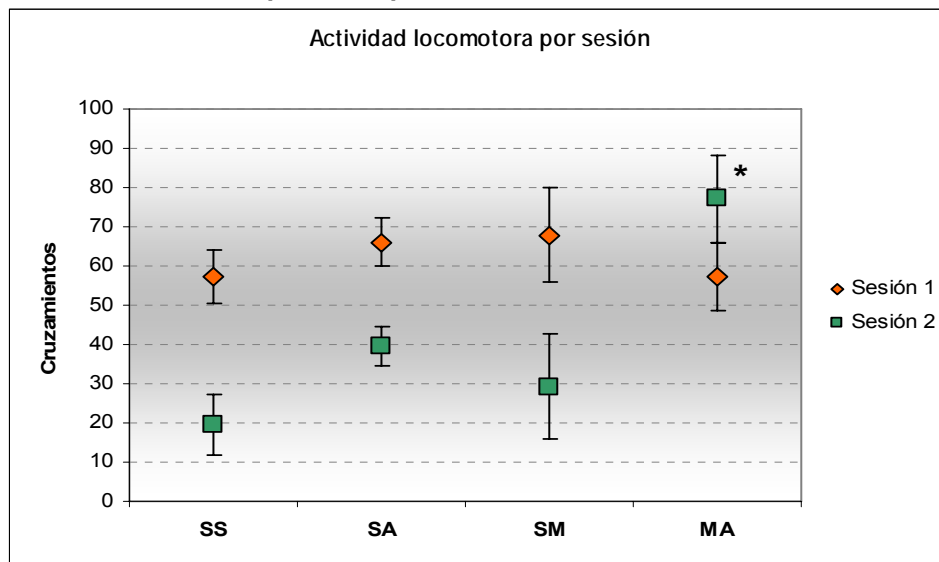
SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol; BAS, basal; PL, post-LCE; M15, minuto 15 post-inyección. *, Promedio del intervalo mínimo en el grupo SA fue menor en el periodo basal que en PL y M15; **, Promedio del intervalo mínimo en el grupo MA fue mayor en el periodo M15 que en BAS y PL.

Resultados del análisis de comportamiento en el LCE

Al final del experimento, del grupo MS se descartó un animal de acuerdo a los criterios de Chauvenet. Con este procedimiento, los valores de las entradas (absolutas y relativas) y las permanencias (absolutas y relativas) a los brazos cerrados y al centro fueron significativamente diferentes de los otros animales de su grupo. Este animal permaneció toda la primera sesión en el lugar 4 (centro) posiblemente debido a un efecto sedante o a alguna patología no detectada.

Comparación de la actividad motora de las ratas sometidas al LCE: Se hizo un ANOVA de 2 vías (TTO y SES) (SES, sesión) para evaluar el parámetro de CRUZAMIENTOS (paso de un brazo al otro sin importar si es abierto o cerrado) del LCE entre los grupos y se hallaron diferencias significativas dependientes del tratamiento, de la sesión y de interacciones entre ellos. Los resultados de resumen en la Tabla 27. No hubo diferencias significativas en SES para el grupo MA ni en los diferentes TTO durante la sesión 1 ($p > 0.05$). En cambio con los demás grupos la actividad locomotora fue mayor en la sesión 1 que en la sesión 2 (Figura 27).

Figura 27. Efectos “mnemónicos” y actividad locomotora expresados por los cruzamientos dentro del LCE para el experimento número 4.



SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol. *, Actividad locomotora fue mayor en el grupo MA en sesión 2 respecto a los demás grupos (ANOVA 2 vías, $p < 0.001$).

Tabla 27. Diferencias significativas en la actividad motora durante el experimento número 4.

Ítem	Factor	Valor de la prueba	Valor de p	Bonferroni
Actividad motora en el laberinto	SES	F [1,62] = 10.278	0.002	S1 > S2
	TTO	F [3,72] = 3.564	0.019	MA > SS
	TTO en S2	F [3,62] = 4.674	< 0.001	MA > SS, SM y SA
	SES en SA	F [3,62] = 4.674	< 0.001	S1 > S2
	SES en SM	F [3,62] = 4.674	< 0.001	S1 > S2
	SES en SS	F [3,62] = 4.674	< 0.001	S1 > S2

SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol; SES, sesión experimental; TTO, tratamiento.

Comparación de las Entradas al brazo abierto (EBA) y del Tiempo en el Brazo Abierto (TBA) para cada sesión (SES) y tratamiento: Pretendiendo verificar el efecto de los fármacos sobre la exploración que hicieron los animales a los lugares de los brazos abiertos durante la primera sesión, se realizaron ANOVA de 2 factores (TTO y LUGAR de Brazos Abiertos) sobre las variables: entradas (**EBA**), tiempo (**TBA**), porcentajes de entradas (**%EBA**) y porcentajes de tiempo (**%TBA**) de los lugares 5, 6 y 7 del LCE (correspondientes a lugares de los brazos abiertos; ver Figura 11).

Los resultados se describen en la Tabla 28. En todos los casos las comparaciones múltiples (Tukey con el grupo SS como control) indicaron que el grupo SS presentó menor exploración de los lugares de los brazos abiertos que los otros grupos y adicionalmente, que el lugar 5 (entrada a los brazos abiertos), fue más explorado que los lugares 6 ó 7 ($p < 0.05$).

Tabla 28. Resultados de ANOVA de 2 factores sobre las variables comportamentales del experimento número 4.

ITEM	FACTOR	Valor de la Prueba	Valor de p	Tukey
EBA	TTO	F[2,93] = 3.047	0,033	SS < SA, SM y MA
	LUGAR	F[3,93] = 9.305	< 0.001	L5 > L6 y L7
%EBA	TTO	F[2,93] = 4.357	0,006	SS < SA, SM y MA
	LUGAR	F[3,93] = 17.939	< 0.001	L5 > L6 y L7
TBA	TTO	F[2,93] = 2.436	0,07	SS < SA, SM y MA
	LUGAR	F[3,93] = 4.468	0,014	L5 > L6 y L7
%TBA	TTO	F[2,93] = 2.436	0,07	SS < SA, SM y MA
	LUGAR	F[3,93] = 4.468	0,014	L5 > L6 y L7

SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol; SES, sesión experimental; TTO, tratamiento; %EBA, entradas al brazo abierto (valor relativo); EBA, entradas al brazo abierto (valor absoluto); %TBA, tiempo en el brazo abierto (valor relativo); TBA, tiempo en el brazo abierto (valor absoluto).

Con el fin de evaluar el fenómeno de “One trial tolerance” se realizaron comparaciones pareadas entre los valores de cada variable obtenida en la primera sesión (EBA,%EBA, TBA y %TBA) con las correspondientes de la segunda sesión. Los resultados se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29. Resultados de las pruebas t pareadas comparando entradas y tiempo en el brazo abierto del laberinto en el experimento número 4.

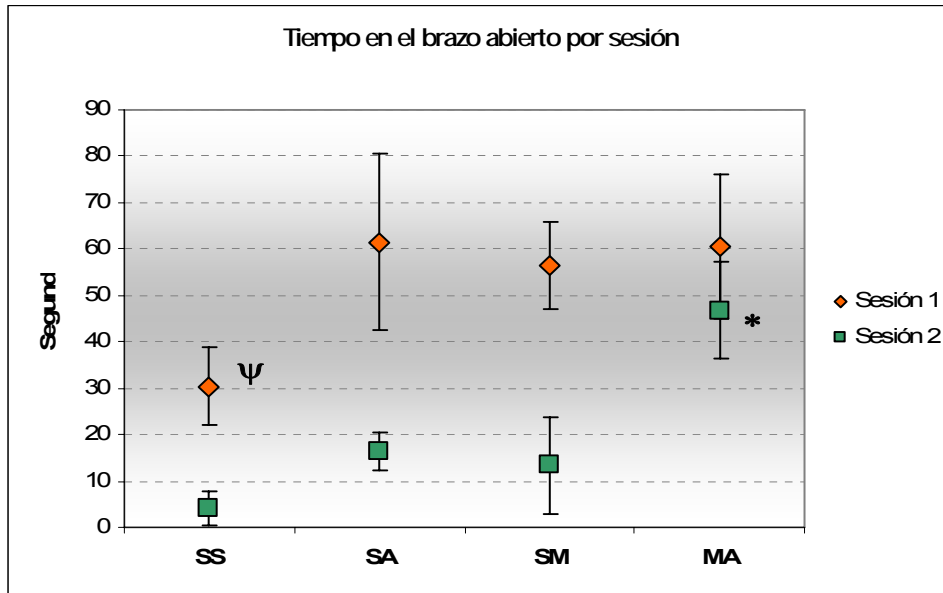
FACTOR	SS		SA		SM		MA	
	<i>t</i>	<i>p</i>	<i>t</i>	<i>p</i>	<i>t</i>	<i>p</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
TBA	2,721	0,026	2,524	0,036	3,253	0,014	0,724	0,49
%TBA	2,72	0,026	2,524	0,036	3,253	0,014	0,723	0,49
EBA	2,771	0,024	2,234	0,056	2,828	0,025	0,224	0,82
%EBA	2,734	0,026	1,085	0,31	4,641	0,002	0,463	0,65

SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol; SES, sesión experimental; TTO, tratamiento; %EBA, entradas al brazo abierto (valor relativo); EBA, entradas al brazo abierto (valor absoluto); %TBA, tiempo en el brazo abierto (valor relativo); TBA, tiempo en el brazo abierto (valor absoluto).

En el grupo de SM la prueba t pareada halló diferencias significativas siendo el TBA en la sesión 1 mayor que en la sesión 2 ($t = 3.253$ con 7 grados de libertad; $p = 0.014$). Para el grupo SA la prueba t pareada halló diferencias significativas siendo el TBA en la sesión 1 mayor que en la sesión 2 ($t = 2.524$ con 8 grados de libertad; $p = 0.036$). Para el grupo SS la prueba t pareada halló diferencias significativas siendo el TBA en la sesión 1 mayor que en la sesión 2 ($t = 2.721$ con 8 grados de libertad; $p = 0.026$). En el grupo de MA la prueba t pareada no halló diferencias significativas entre ambas sesiones sobre el TBA (Figura 28).

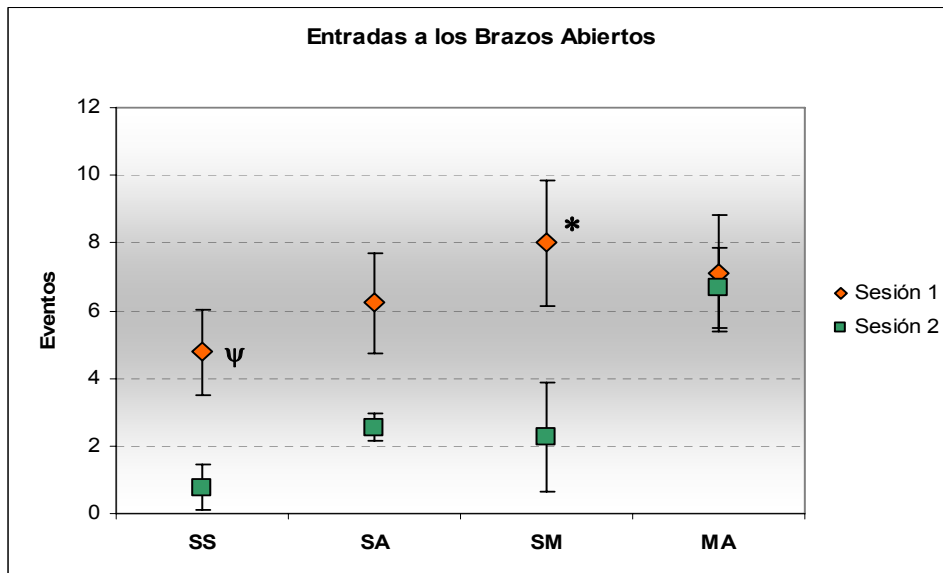
El análisis de las pruebas t pareadas sobre las EBA de ambas sesiones para cada grupo se presenta en la Tabla 29. En el grupo de SM la prueba t pareada halló diferencias significativas siendo mayor el número de EBA en la sesión 1 que en la sesión 2 ($t = 2.828$ con 7 grados de libertad; $p = 0.025$). Para el grupo SS la prueba t pareada halló diferencias significativas siendo el TBA en la sesión 1 mayor que en la sesión 2 ($t = 2.771$ con 8 grados de libertad; $p = 0.024$). Para el grupo SA la prueba t pareada tampoco halló diferencias significativas en el número de EBA pese a que el valor de p fue limítrofe ($p = 0.056$) pero también hubo un poder bajo en la prueba ($1-\alpha = 0.412$). En el grupo de MA la prueba t pareada no halló diferencias significativas entre ambas sesiones sobre el TBA (Figura 29).

Figura 28. Diferencias significativas y efectos “mnemónicos” expresados en el tiempo en el brazo abierto (TBA) del experimento número 4.



SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol; *, TBA en el grupo MA fue mayor en la sesión 2 que en los demás grupos (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$); ψ , TBA en el grupo SS fue menor en que en los demás grupos durante la sesión 1 (ANOVA de 1 vía, $p < 0.001$).

Figura 29. Diferencias significativas y efectos “mnemónicos” expresados en las entradas al brazo abierto (EBA) del experimento número 4.



SS, solución salina; SA, solución salina + atenolol; SM, solución salina + midazolam; MA, midazolam + atenolol; *, EBA en el grupo SM fue mayor en la sesión 1 que en la sesión 2 (t pareada, $p = 0.025$); ψ , EBA en el grupo SS fue mayor en la sesión 1 que en la sesión 2 (t pareada, $p = 0.024$).

8. DISCUSION

El presente proyecto tiene por objetivo evaluar los efectos mnemónicos y ansiolíticos de la aplicación de diferentes fármacos dentro del paradigma de la prueba de Laberinto en Cruz Elevado considerada un modelo experimental de ansiedad generalizada. Las diferentes intervenciones hechas han perseguido el objetivo de actuar como moduladores de las respuestas emocionales de los animales sometidos a la prueba del laberinto. El propósito principal fue intervenir sobre el Sistema Nervioso Autónomo periférico (**SNAP**) de la rata Wistar-UIS, activándolo o inhibiéndolo con distintos fármacos, para explorar de acuerdo a la *teoría del origen periférico de las emociones* acorde a lo postulado por James y Lange (Ellsworth 1994) sus efectos en la emocionalidad y la memoria emocional. Esta teoría en principio fue relegada porque iba en contraposición a la teoría propuesta por Cannon y Bard quienes planteaban con su *teoría del origen central de las emociones* al Sistema Nervioso Central (**SNC**) como el órgano donde se originaban las emociones (experiencia emocional) y a partir de ello se producían las respuestas emocionales (somáticas y viscerales); no obstante, con el paso del tiempo se han venido encontrando evidencias que respaldan la teoría del origen periférico de las emociones o las contribuciones periféricas a tales emociones (Carlson *et al.* 2005a; Critchley *et al.* 2005; Gray *et al.* 2007; Pollatos *et al.* 2005; van Stegeren *et al.* 1998).

Se han hecho intervenciones en el presente estudio para activar e inhibir el Sistema Nervioso Autónomo periférico puesto que existe una amplia evidencia de efectos deletéreos sobre la memoria asociada a emociones cuando se administran fármacos inhibidores de las respuestas del SNA pero los estudios previos en su mayoría han utilizado preparaciones que se aplican directamente a nivel de algunas estructuras del SNC o que cruzan fácilmente la barrera hematoencefálica. Así mismo, la administración de sustancias activadoras del SNA ha mostrado mejoría del desempeño en las pruebas que evalúan la memoria asociada a emociones pero los resultados tienen la misma limitación que los obtenidos por el uso de inhibidores pues de una u otra forma terminan actuando sobre estructuras del SNC. La Adrenalina es una molécula polar y por tal razón no cruza la barrera hematoencefálica en condiciones normales; por su parte el Atenolol es una molécula hidrofílica y sólo puede superar la barrera hematoencefálica en condiciones muy especiales que no son las fisiológicas (Abrahamsson *et al.* 1989; Agon, 1991; Goodman *et al.* 2006; Muller *et al.* 2005).

Hay reportadas varias evidencias de las influencias β -adrenérgicas en los procesos de memoria dentro del complejo amigdaloides. La inyección intra-amígdala post-entrenamiento de Propranolol, antagonista β -adrenérgico, bloquea los efectos facilitadores de memoria de la Adrenalina y así mismo ocurre cuando

se emplea la Noradrenalina en protocolo similar (Liang *et al.* 1986). El almacenamiento de la memoria se mejora cuando se administra Clenbuterol, agonista β -noradrenérgico, bien sea intra-amígdala o sistémico (Introini-Collison *et al.* 1991). Además la lesión de la *stria terminalis*, una vía aferente/eferente principal del complejo amigdalino, genera bloqueo de las mejoras de memoria cuando se administra Adrenalina y Clenbuterol vía sistémica o Noradrenalina vía intra-amígdala (Introini-Collison, Miyazaki, y McGaugh 1991; Liang y McGaugh 1983).

Se ha evidenciado que la administración sistémica o intra-amígdala de agonistas de GABA y opiáceos producen desmejora de la memoria (Castellano *et al.* 1989; Castellano *et al.* 1990; Izquierdo y Graudenz 1980; McGaugh *et al.* 1993) pero estos efectos son bloqueados al administrar antagonistas β -adrenérgicos intra-amígdala (Ammassari-Teule *et al.* 1991; Introini-Collison *et al.* 1989). Tomando en conjunto estas evidencias sugieren que los sistemas neuromoduladores de la memoria a nivel de la amígdala dependen de la liberación de Noradrenalina y la consiguiente activación de receptores β -adrenérgicos (McGaugh *et al.* 1993), siendo las interacciones de estos receptores dentro de la amígdala las que determinan los efectos de estas sustancias en el almacenamiento de la memoria (Introini-Collison *et al.* 1996).

Podrían agruparse los experimentos en 3 bloques grandes acorde a los parámetros que se evaluaron: primero, variables fisiológicas (FC, FR, VO₂); segundo, análisis de variabilidad de la frecuencia cardiaca (HRV); tercero, análisis del comportamiento de las ratas durante la prueba del LCE.

Hallazgos generados del estudio de las variables fisiológicas.

Los resultados experimentales evidenciaron que la cepa de ratas Wistar UIS posee unos parámetros basales similares a los de otras cepas de ratas Wistar ya referenciadas en la literatura científica y que han sido sometidas a experimentos (Aubert *et al.* 1999) que incluyen análisis de variables fisiológicas y de variabilidad de frecuencia cardiaca (HRV); por otra parte, se pudo establecer una correlación entre el VO₂ y el tiempo experimental transcurrido en la cual se hizo evidente que las ratas presentan un fenómeno de *habitación* a la cámara hermética donde se hicieron los registros de manera que presentan una tendencia a disminuir el VO₂ a medida que permanecen más veces dentro de la cámara hermética. (Fauchier *et al.* 2006; Kuo y Yang 2004).

Se han descrito mecanismos de analgesia dependientes de opioides endógenos y otros neurotransmisores en las ratas cuando se les somete a pruebas que generan ansiedad (Coderre y Rollman 1984; Cristea *et al.* 1995; Haulica *et al.* 1995; Terman *et al.* 1984; Vitale *et al.* 2005). A partir de estos se consideró como hecho importante la evaluación del efecto de la inyección de SS por vía i.p. y si

había retorno a las condiciones basales 30 minutos después de aplicar la inyección de manera tal que pudiera definirse el impacto de la inyección en las variables fisiológicas, para tener esto en cuenta cuando se administraran fármacos, puesto que dicho efecto se podría considerar como un factor de interferencia que podría tener algún peso a la hora de evaluar e interpretar los resultados teniendo presente que esta serie de experimentos se habría de ejecutar en ratas no anestesiadas donde el dolor se mantiene en condiciones similares a las habituales para una rata enclaustrada en un bioterio experimental. En nuestro estudio la inyección intraperitoneal de SS no ejerció efecto alguno a largo plazo en las variables fisiológicas de las ratas.

El propósito de evaluar las ratas sin anestesarlas fue encaminado por la necesidad de analizar las variables fisiológicas y de variabilidad de la frecuencia cardiaca en las condiciones habituales usadas para la prueba del LCE, de forma tal que puedan instaurarse como parámetros adicionales de evaluación a los ya existentes (TBA absoluto y relativo; EBA absolutas y relativas; actividad locomotora; valoración del riesgo).

Se evidenció que la inyección vía i.p. del vehículo no generó alguna diferencia significativa en las variables fisiológicas de las ratas para cada uno de los periodos evaluados: basal, post-inyección (inmediato) y 30 minutos después de la inyección. Tampoco se evidenciaron diferencias significativas al comparar los periodos PI y M30 con el BAS. Se hizo evidente una correlación entre la FC y el VO₂ después de la inyección del vehículo en la que ambas variables tienden a incrementarse juntas y esto se confirmó por medio de un análisis de regresión lineal, esta correlación puede validarse a través de la medición del gasto energético (1 mL de Oxígeno aporta 4.86 Kcal) al convertirlos en equivalentes metabólicos (**MET**) la cual es una medida inferida del VO₂ a partir de la FC, dando certeza que los registros de ambas variables son confiables no obstante deben hacerse algunas correcciones para estimarlo adecuadamente (3,5 Kcal por mL. de Oxígeno consumido) según sea el caso (Ainsworth *et al.* 2000; Moral 2007). A partir de estos hallazgos se determinó que el efecto de la inyección *per se* no era crucial como para tener que realizar algún ajuste especial para los protocolos experimentales futuros.

Las diferentes dosis de Adrenalina (**AD**) utilizadas en el experimento 3 etapa 1 permitieron evidenciar los cambios en las variables fisiológicas generados por la administración de este estimulante del SNAP. En general, para la FC se observó un aumento independiente de la dosis porque con la dosis considerada como *intermedia* (0.05 mg/Kg) se hizo evidente una FC mayor; no obstante, los efectos de las dosis a los 30 minutos después de haberlas inyectado persistieron aunque en menor grado en los grupos de dosis *menor* (0.01 mg/Kg) y *mayor* (0.1 mg/Kg) mientras que en la dosis *intermedia* no hubo diferencia con el basal. Estos hallazgos reproducen el comportamiento descrito de la Adrenalina en los libros clásicos de farmacología (Goodman et al. 2006).

Respecto a la FR se evidenciaron diferencias significativas al comparar los valores de PI con el basal para todos los grupos, pero en la comparación del valor en M30 con el basal los cambios persistieron en los grupos de las dosis 0.01 y 0.05 mg/Kg. Con relación al VO₂ sólo hubo diferencias significativas en el grupo de 0.01 mg/Kg para los periodos PI y M30 comparados con el basal; en los demás no hubo diferencias significativas. Con los hallazgos presentes se concluye que la Adrenalina tiene un efecto dependiente de la dosis en el consumo de oxígeno puesto que en dosis bajas y altas produjo una disminución del VO₂ a expensas de activación de vías anaerobias del metabolismo energético; hallazgos similares fueron reportados por Mallefet y Baguet quienes midieron el VO₂ en células de los fotóforos abdominales de peces los cuales tienen un consumo de oxígeno estable en condiciones de reposo y cuando se les puso en contacto con Adrenalina redujeron en 78% la captación de oxígeno, igualmente cuando en presencia de Adrenalina estimularon los fotóforos para que emitieran luz el VO₂ no superó al registro de las condiciones de reposo sin Adrenalina. En ratas, Bihler y colaboradores hallaron que las dosis bajas de Adrenalina produjeron disminución en el transporte basal de azúcar del músculo diafragma, el cual fue aislado intacto para los experimentos mientras que las dosis altas produjeron aumento del transporte basal de azúcar, pero esto podría cambiar las condiciones respecto a un sistema complejo como lo es un ser vivo cuando se le compara con un órgano aislado (Bihler *et al.* 1978; Mallefet y Baguet 1987; Sloan *et al.* 1978).

Para el experimento 3 etapa 2 se tuvo como punto de partida los hallazgos de la primera etapa que consistió en la exploración de varias dosis de AD y sus efectos sobre las variables fisiológicas y para la segunda etapa se seleccionó la dosis de AD considerada como la más adecuada de la etapa 1, es decir, la dosis de 0,1 mg/Kg porque fue la que mostró efecto significativo no debido al azar en relación al promedio de la FC y la FR justo después de haberla inyectado y mantuvo dicho aumento de la FC 30 minutos después, a diferencia de las otras dosis que no generaron incrementos (0,01 mg/Kg) de la FC o si lo hicieron el efecto no fue sostenido (0,05 mg/Kg) (*ver Figura 12*). Debido al hecho que el análisis de HRV era el parámetro que tendría mayor utilización dentro del abordaje de los datos que produjera el experimento se decidió preferir la dosis que mantenía su efecto en el tiempo sobre la variable FC para poder valorar más fielmente los efectos de la intervención farmacológica (Seely y Macklem 2004).

En general se halló aumento de los promedios de FC, FR y VO₂ en el grupo tratado con Adrenalina comparado con el grupo de Solución Salina, siendo evidentes los aumentos de estas variables fisiológicas en el periodo PL y en M30 (*ver Tabla 14 y Figura 15*). Este es un hallazgo que está acorde a lo esperado puesto que la prueba del LCE es un modelo de ansiedad generalizada y *per se* condiciona a la generación de una emoción (miedo) y las emociones producen respuestas de adecuación (comportamentales, autonómicas y hormonales) acorde a la situación en que se convierten, siendo en este caso el miedo un activador de

respuestas fisiológicas asociadas al SNA que preparan al animal para una confrontación potencial con algún depredador (Blanchard y Blanchard 1988; Carlson et al. 2005b; Cruz, Frei, y Graeff 1994). Consecuentemente, se espera que la prueba de LCE produzca igual influencia sobre las ratas de ambos grupos en relación a la producción endógena de Adrenalina y que la diferencia entre grupos en sus variables fisiológicas esté dada por el fármaco inyectado, siendo la Adrenalina un activador del SNA se espera que existan mayor frecuencia cardiaca y respiratoria comparados con el grupo al que sólo se le inyectó el vehículo porque el LCE estaría aumentando aún más los niveles séricos de Adrenalina en las ratas que recibieron el fármaco, estos hallazgos se evidenciaron en el presente experimento donde hubo diferencias significativas de FC y FR asociadas al TTO (ver *Tabla 14*). Con relación al consumo de oxígeno, se esperaría que no existieran diferencias porque con hallazgos previos con Adrenalina en las dosis elegidas no se evidenciaba aumento del VO₂ y en nuestro experimento se halló aumento del VO₂ pero dependiente del periodo experimental más no del TTO (ver *Tabla 14*).

En el experimento número 4 cuando se quiso evaluar el efecto del Atenolol en el promedio de la FC, se observó exclusivamente en el periodo post-LCE, una diferencia estadísticamente significativa del grupo SA y MA comparado con los grupos SM y SS, teniendo frecuencias menores para el grupo SA y esto confirma el efecto beta-bloqueador del Atenolol y se mantiene a pesar de haber sometido las ratas al LCE; no obstante no hubo diferencias significativas entre SA y MA que sugirieran la existencia de un efecto aditivo en la disminución de la FC al adicionar un ansiolítico al tratamiento, por el contrario, se halló una tendencia al aumento en la FC en el grupo al que se aplicó Midazolam y esto puede deberse al efecto parasimpaticolítico del fármaco que ha sido descrito en estudios anteriores que han sido realizados sobre benzodiazepinas (Adinoff *et al.* 1992; DiMicco 1987; Vogel *et al.* 1996). A pesar de haberse evidenciado esta tendencia al aumento de FC, en el presente estudio no se encontró diferencias significativas al comparar la FC de los grupos SA y MA en un ANOVA de 2 vías.

Con relación a la frecuencia respiratoria en estos grupos de experimentación en el periodo post-LCE, se evidenció una diferencia estadísticamente significativa del grupo SS donde el promedio fue mayor al compararlo con los demás grupos y de particular interés es el hallazgo del grupo SM en el que se encontró la mayor disminución de la FR seguido por los grupos MA y SA; la exposición al LCE produjo hallazgos divergentes en relación al fármaco administrado pues en el caso del grupo tratado con Midazolam se halló predominio del efecto farmacológico (disminución de la FR) que no fue revertido por la exposición al LCE, por el contrario, en los grupos tratados con Atenolol si hubo aumento de la FR después del LCE sugiriendo que la administración de Atenolol puede estar interfiriendo con la bradipnea ocasionada por el Midazolam. A partir de esto podría deducirse que el efecto depresor del Midazolam en la FR no se potencia al adicionarle un fármaco betabloqueador y sumando este hallazgo con el de la frecuencia cardiaca

se podría proponer que el Midazolam y el Atenolol están actuando por mecanismos diferentes no sinérgicos o pueden estar teniendo un efecto de antagonismo parcial entre las sustancias; sin embargo, la exploración de estas posibilidades dentro de la farmacocinética de estos medicamentos supera el alcance del presente estudio.

Es de notoria trascendencia el hallazgo del aumento del consumo de oxígeno (VO₂) en el grupo tratado con SM el cual fue mayor que el de los demás grupos tanto en los registros hechos post-LCE como en los realizados 15 minutos después de inyectar las sustancias evidenciándose un efecto paradójico pues disminuyó la FR pero aumentó el VO₂ en ambos periodos dentro del mismo grupo, y dentro de los aumentos de VO₂ lo hizo de forma más acentuada en el grupo de post-LCE lo cual apuntaría a que la prueba de ansiedad generalizada ejercería un efecto activador del metabolismo aerobio de los animales expuestos a al LCE que bien podría deberse al aumento en la actividad del sistema simpático o al simple aumento sostenido de la FC; no obstante, en el grupo de MA hubo menor VO₂ que en el de SM y esto podría estar a favor del aumento de la FC como factor decisivo en el aumento del VO₂ para los grupos tratados con Midazolam pese al hecho de que en el presente estudio no pudo evidenciarse diferencias significativas de la FC durante el periodo post-LCE entre estos 2 grupos (MA y SA) y no es posible atribuirle la causa del aumento del VO₂ a este único factor aislado sin perder de vista el hallazgo de una muy discreta tendencia a mayores cifras de FC en el grupo SM durante los periodos PL y M15.

También merece mención en el experimento 4 el aumento del VO₂ en los diferentes grupos de tratamiento donde se evidenció por regla general un incremento mayor para el periodo PL comparado con el M15 en una proporción muy similar entre los grupos excepto para el grupo SA donde se observó que en M15 era mayor que PL pero no hubo diferencia significativa entre estas dos etapas (ver Figura 22); en relación a esto se podrían plantear hipótesis que expliquen tal hallazgo: primero, debido a la activación simpática que podría ejercer la prueba del laberinto y que fue contrarrestada con la administración de Atenolol (β -bloqueador), segundo, un menor VO₂ en PL por la menor actividad locomotora en el LCE dentro del grupo SA pues no se le administró ansiolítico no obstante se halló actividad similar entre los cuatro grupos cuando se evaluó por el parámetro de cruzamientos (ver Figura 27).

Hallazgos generados del estudio de la variabilidad de la frecuencia cardiaca.

La evaluación de la variabilidad de la frecuencia cardiaca (HRV) se ha convertido en una herramienta útil para la valoración de los diferentes parámetros que indican activación o atenuación del SNA (Friedman y Thayer 1998), a través de los diferentes abordajes que se han desarrollado dentro del análisis de HRV en seres humanos se ha podido establecer la presencia de algunos atributos que son

considerados normales dentro del grueso de la población y algunos que son característicos de ciertos estados considerados como enfermedad, tanto orgánicos como mentales (Buchanan *et al.* 1993; Dishman *et al.* 2000; Landen *et al.* 2004; Lavoie *et al.* 2004; Tulen *et al.* 1994). También se ha utilizado en la exploración de estados de activación del SNA en humanos cuando se les expone a una prueba de memoria asociada a emociones encontrando que el bloqueo β -adrenérgico produce desmejora en el recuerdo libre de una prueba de memoria emocional (van Stegeren *et al.* 1998) o evaluaciones de memoria no asociada a emociones hallando patrones característicos, por ejemplo, los trabajos de Hansen hallaron que en grupos de humanos con mayor variabilidad de frecuencia cardiaca tuvieron mejor desempeño en una prueba ejecutiva de memoria de trabajo, por otra parte Redondo y Del Valle encontraron que la variabilidad disminuía a medida que aumentaba la complejidad de la tarea en una prueba de memoria no asociada a emociones (Hansen *et al.* 2003; Hansen *et al.* 2004; Redondo y Del Valle-Inclán 1992).

En ratas se han hecho progresos sobre este mismo tópico, lográndose hallazgos que son útiles en la evaluación de terapéutica farmacológica, por ejemplo el bloqueo β -adrenérgico con Propanolol produce depresión en el poder del espectro de baja frecuencia (escala lineal) y no modifica el estudio de escala no lineal, mientras que el bloqueo α -adrenérgico no modifica el poder espectral pero sí modifica los hallazgos del estudio de escala no lineal (Beckers *et al.* 2006; Howarth *et al.* 2005), estados de enfermedad cardiovascular y de otros órganos (Fauchier *et al.* 2006; Ponard *et al.* 2007) y también para evaluar los efectos de exposición de sustancias contaminantes (Elder *et al.* 2007; Kuznetsov *et al.* 2007; Rowan, III *et al.* 2007). En síntesis, se ha determinado que la activación simpática reduce variabilidad, la activación parasimpática aumenta variabilidad y a partir de ello se pueden construir herramientas de análisis adaptables a la necesidad del investigador (Hartikainen *et al.* 1998).

No obstante, también se ha utilizado como un sistema de evaluación de estados de activación del SNA en respuesta a paradigmas de experimentación de contenido emocional, tal es el caso de los hallazgos de Depino y Gross, quienes expusieron ratones BALB/c y C57BL/6 a una exploración libre en un campo abierto hallando comportamientos tipo-ansioso aumentados, menor FC y HRV aumentada en la cepa BALB/c, realizaron un análisis de regresión y hallaron correlación significativa entre la FC y la HRV medida a largo plazo (componentes de baja y muy baja frecuencia) con la actividad locomotora y el tiempo en el centro del campo; Takeuchi y colaboradores hallaron algunos patrones de disminución del exponente β calculado a partir del promedio de los intervalos R-R cuando sometían ratas Wistar a estrés crónico por 2 semanas, mientras que la temperatura corporal y la FC aún no mostraban cambios (Depino y Gross 2007; Takeuchi *et al.* 2001). Pero dentro del paradigma del LCE hasta el momento no se han abordado este tipo herramientas hasta el momento; existen trabajos previos que han abordado el comportamiento de variables como frecuencia cardiaca y

presión arterial sin hacer estudio de su variabilidad además confinando las ratas a los brazos abiertos o cerrados lo cual no se asemeja a la presente serie experimentos y dentro de los hallazgos de estos investigadores se puede resaltar que la inyección intraperitoneal de Atenolol+Atropina no interviene en el efecto de los agonistas GABA inyectados en el hipotálamo (Shekhar 1993; Shekhar *et al.* 1993), es evidente que hace falta precisar detalles sobre estos hallazgos pues las intervenciones farmacológicas fueron varias y no es el protocolo habitual del laberinto en cruz elevado para medir el efecto ansiolítico de un fármaco.

En concordancia con lo anteriormente expuesto sobre las variables fisiológicas en el experimento 3 etapa 2, los parámetros del electrocardiograma relacionados con la duración promedio de los intervalos R-R, a la mediana y el promedio de las medianas sufren cambios similares a los presentados por las restantes variables fisiológicas. La Adrenalina ejerce un efecto acelerador de la frecuencia cardiaca y por ese motivo estos parámetros sufrieron una disminución de su valor en tiempo (milisegundos) en el grupo tratado con esta sustancia comparados con el grupo al que sólo se le inyectó el vehículo (*ver Figuras 13, 14, 15 y 17*).

En el experimento número 4 se observó que el promedio del tiempo de los intervalos R-R en los 3 periodos de medición para el grupo tratado con SS no presentó diferencias significativas, lo cual sugiere que el estímulo doloroso y la manipulación durante las 2 inyecciones de Solución Salina al 0,9% p/v vía i.p. puede ser equivalente con someter las ratas por 5 minutos a la prueba del LCE (y viceversa) desde el punto de vista del análisis de la frecuencia cardiaca y ante la ausencia de una intervención farmacológica el retorno a la condición basal es rápido comparado con los hallazgos de los demás grupos, es importante aclarar en este punto que los datos correspondientes a los periodos BAS y M15 pertenecen al grupo al que se hizo la titulación de los fármacos pues en el protocolo de LCE no se hizo registro basal para no estresar a los animales en grado mayor al producido por manipularlos e inyectarlos con el propósito de ajustar el ensayo a los protocolos clásicos de evaluación del LCE (*ver Figura 20*). Además, en los grupos tratados con Atenolol se evidenció un aumento del promedio de tiempo de los intervalos R-R después de haber sido inyectados con el fármaco (periodos PL y M15), en virtud de esto se hace evidente desde el punto de vista de la farmacodinámica el efecto bloqueador de la sustancia sobre los receptores β -adrenérgicos y por tal razón no hay aumento de la frecuencia cardiaca; no obstante, hubo un mayor promedio en los intervalos R-R del grupo tratado con Midazolam + Atenolol en el periodo M15 comparado con los grupos SM y SS lo cual es resultado del efecto del β -bloqueador y del efecto cardioacelerador del midazolam. Es de notorio interés que la aplicación de Midazolam sin Atenolol produjo una disminución del intervalo R-R en las ratas de ese grupo apuntando a un probable efecto inhibitorio del sistema parasimpático sobre el cual en el presente estudio no es posible determinar si es de origen central o de origen periférico (*Figura 23*). Sobre este fenómeno, con la evidencia actual hay más factores a favor que en contra de un bloqueo a nivel central por

medio de un efecto cardioacelerador por bloqueo núcleos centrales del parasimpático; hasta la fecha no se ha descrito efecto α antagonista en el Midazolam, no obstante se han descrito efectos tocolíticos del mismo y otras benzodiazepinas a través de la posible modulación de receptores α_1 - adrenérgicos (Zupko *et al.* 2003).

Estos hallazgos también se hacen evidentes en el cambio del promedio de la mediana de las frecuencias relativas acumuladas de intervalos R-R, a través de esta técnica de análisis donde se pueden reconstruir a través de imágenes los perfiles de los efectos farmacológicos de las sustancias y evidenciar gráficamente los cambios que hacen parte de la farmacodinámica de una sustancia (Figuras 14, 24 y 25).

Ya propiamente sobre el terreno del análisis de HRV dentro del presente experimento se evidenciaron cambios en las variables evaluadas; una de ellas fue el RMSSD en donde se evaluó la raíz cuadrada de las diferencias de los intervalos R-R adyacentes (actual con el previo) lo cual le da una mayor solidez desde el punto de vista estadístico (Seely y Macklem 2004) y genera un resultado en unidades de milisegundos; en este parámetro se hallaron diferencias en el periodo siendo mayor en los periodos BAS que en los periodos M15 evidenciando que en los periodos basales hay una mayor fluctuación entre los intervalos R-R y esto es algo que se disminuye cuando existen intervenciones (vg. fármacos, dolor debido a la inyección, manipulación como factor generador de ansiedad entre otros) que de alguna forma modulan la frecuencia cardiaca generando una menor fluctuación entre los intervalos R-R. En el presente estudio no se hallaron diferencias en el RMSSD entre el periodo PL comparado con el basal.

En el ámbito clínico hoy en día es de amplia utilización los indicadores **pNNx** para la construcción de indicadores predictivos de desenlace en ciertos estados patológicos que tienen relación con el sistema cardiovascular (Abe *et al.* 2002; Govindan *et al.* 2007; Uehara *et al.* 1999; Wennerblom *et al.* 2000) y en años recientes se han empezado a explorar este tipo de hallazgos en patologías de sustrato mental como la esquizofrenia, trastornos del ánimo bipolar y trastornos de ansiedad entre otros (Boettger *et al.* 2006; Carpeggiani *et al.* 2005; Pieper *et al.* 2007; Voss *et al.* 2006). En humanos, se ha establecido como un criterio predictivo el indicador pNN50, que representa la proporción de diferencias de los intervalos R-R consecutivos mayores a 50 milisegundos, como indicador de pronóstico para enfermedades como el infarto agudo del miocardio y la falla cardiaca (Mietus *et al.* 2002; Ponikowski *et al.* 1997; Yildirim *et al.* 2007).

Evidentemente, en las ratas este nivel de diferencias de 50 milisegundos es prácticamente improbable de hallar en condiciones normales pues el corazón de la rata late en promedio 300 a 350 veces por minuto (aproximadamente 6 Hz) mientras que el de un humano adulto lo hace 70 a 90 veces por minuto y no supera los 200 a 220 latidos por minuto (menos de 4 Hz). Los hallazgos del

presente experimento han evidenciado al indicador **pNN15** como uno sensible a los cambios de HRV que podrían estar indicando cambios debidos a activación del sistema simpático en ratas puesto que se evidenciaron diferencias (por tratamiento farmacológico en el 3 y por etapa experimental en el 4) entre los grupos de los mencionados experimentos cuando se hizo el análisis de este indicador, el cual cuenta los intervalos consecutivos mayores de 15 milisegundos y los reporta como un porcentaje respecto al número total de las diferencias R-R. Es probable que en futuros experimentos se pueda instaurar esta medida como una de las que pueden tener algún valor predictivo en el análisis de HRV en ratas. A pesar que se hallaron otros indicadores de pNNx con diferencias significativas en los diferentes experimentos, no estuvieron presentes en ambos lo cual les resta atribución como una medida robusta de HRV en ratas.

Con el cálculo de indicadores como el **%nPOS** y **%nNEG** se puede valorar la desaceleración y aceleración inmediata respectivamente entre los intervalos R-R; de forma que si existe una intervención que genera una aceleración en la frecuencia cardiaca tendrá mayor cantidad de diferencias menores que cero y en general con un aumento del **%nNEG**. Sucede al contrario con el indicador de **%nPOS** donde se evidencia que hay poca ocurrencia de acortamiento de los intervalos R-R y por eso se presentan principalmente diferencias mayores a cero en los intervalos adyacentes.

Sobre el **%nPOS** y **%nNEG** en experimento 3 etapa 2 se encontraron diferencias significativas en el grupo tratado con SS el **%nPOS** fue mayor en el periodo PL que en M30 y como complemento el **%nNEG** fue menor en el PL que en M30, esto podría explicarse por un mecanismo compensatorio de la taquicardia generada por la activación adrenérgica originada por la exposición al laberinto que deriva en una tendencia a la desaceleración de la FC y por ende a un aumento en **%nPOS** al salir del laberinto; de forma contraria, cuando se realiza el registro en M30 hay una tendencia a la aceleración de la FC originada por la manipulación de la rata acortándose los intervalos R-R y derivando en un aumento del **%nNEG**.

En el grupo tratado con AD no se presentaron diferencias en estos parámetros arriba mencionados, puesto que el fármaco está ejerciendo su efecto y evita que se presente el mecanismo compensatorio de la taquicardia al salir del LCE, así mismo, como persiste en su efecto a los 30 minutos después de la inyección se encontrará un predominio de intervalos R-R cortos y habrá poca oportunidad de aumento de la FC porque el tejido miocárdico y el sistema de conducción eléctrica del corazón tienen unas propiedades intrínsecas y un periodo refractario que deben obedecer entre cada evento de despolarización.

Para el experimento número 4, a partir de los hallazgos se concluye que en el periodo BAS hubo una tendencia a diferencias de intervalos R-R mayores a cero debido a la poca frecuente aceleración entre los mismos comparados con los hallazgos del periodo M15; por el contrario, en el grupo tratado con MA hubo

menor proporción de diferencias mayores a cero lo cual indicaría una tendencia al acortamiento de las diferencias de tiempo entre intervalos R-R adyacentes, es decir, a la aceleración de la frecuencia cardiaca cuando se le compara con los grupos tratados con SA y SS.

Los mecanismos fisiológicos responsables de cambios rápidos e instantáneos de la frecuencia cardiaca son principalmente parasimpáticos (Levy 1990; Thayer y Ruiz-Padial 2006). En condiciones normales, cuando se estimula las fibras vagales (colinérgicas) que llegan al tejido nodal se produce una hiperpolarización por el aumento en la conductancia de potasio en la membrana derivada de la liberación de acetilcolina, esta acción está mediada por receptores muscarínicos (M2) además que disminuye el AMPc en las células y esto ocasiona una reducción en la abertura de los canales lentos de calcio, como resultado se produce un descenso en la frecuencia de descarga. Por el contrario, cuando se produce estimulación en los nervios simpáticos, la noradrenalina secretada se une con los receptores β_1 y produce un aumento del AMPc intracelular que facilita la abertura de los canales lentos de calcio, esto genera un aumento de la corriente de calcio y de la rapidez de la fase de despolarización de la célula del nodo. (Ganong 2006). A partir de esto se deduce que un posible bloqueo de las aferencias parasimpáticas cardiacas ejercido por el Midazolam genera el aumento de la FC observado y se correlaciona con la disminución del %nPOS evidenciado.

En síntesis, si hay una menor frecuencia cardiaca se esperaría que hubiese mayor variabilidad en la ocurrencia de estos 2 eventos puesto que dentro del caos que gobierna los sistemas biológicos pueden ocurrir intervalos más largos o cortos respecto a su antecesor y de todas formas el sistema cumple eficientemente con su labor dentro de ciertos rangos de frecuencia de operación en el caso del latido cardiaco, cuando hay alguna situación que genere alteración que caiga fuera de estos rangos se producirá una alteración en el equilibrio del sistema que puede desencadenar consecuencias de diversos grados de severidad, produciendo estados catalogados como enfermedad e incluso poner en riesgo la supervivencia del sistema.

La duración de los intervalos es una forma indirecta de estimar las variaciones en la frecuencia cardiaca en un registro electrocardiográfico, porque la duración de los intervalos tienen una relación inversamente proporcional con la frecuencia cardiaca, es decir, a menor duración de los intervalos la frecuencia cardiaca es mayor y viceversa. Con el propósito de establecer una medida de tendencia de la frecuencia cardiaca en los diferentes registros electrocardiográficos se hizo una técnica de análisis que contempló la duración del máximo intervalo en cada electrocardiograma y también se hizo análisis contemplando la duración del mínimo intervalo. Los hallazgos para el experimento número 3 se manifestaron con la presencia de diferencias significativas para la duración promedio del máximo intervalo el cual fue mayor en el grupo de SS y el promedio del mínimo intervalo tuvo una duración más corta en el grupo de Adrenalina. A partir de esto

se evidencia que en el grupo de SS los intervalos R-R fueron de mayor duración y esto se traduce en una tendencia a presentar una FC menor, mientras que en el grupo de AD se tuvo una tendencia a que los intervalos R-R fueran de menor duración, es decir a que se presente una mayor FC; el propósito de esta medida era construir una herramienta adicional (o alternativa a los ya descritos; ver Seely y Macklem 2004) que permitiera validar los efectos de los fármacos sobre la FC.

Para las ratas del experimento número 4 los hallazgos con relación al indicador **máximo intervalo** se refieren al hallazgo de diferencias significativas en el promedio del tiempo del intervalo R-R máximo para el grupo MA donde fue mayor que en el grupo SM durante el periodo M15; este hallazgo esta a favor del efecto cronotrópico negativo que ejerce el Atenolol y logra establecer una diferencia entre los dos grupos tratados con Midazolam cuando se les hace registro en este punto del experimento, el bloqueo β 1-adrenérgico del Atenolol no se evidencia de forma inmediata en este caso, lo cual está a favor del predominio del sistema parasimpático en el control rápido de la FC (Thayer y Ruiz-Padial 2006). El indicador de **mínimo intervalo** en el experimento número 4 permite, a partir de las diferencias estadísticamente significativas, concluir que los grupos a los que se les inyectó Atenolol (SA y MA) tuvieron un promedio de mínimo intervalo de mayor duración respecto al basal, mientras que en el grupo tratado con SM y en el grupo tratado con SS el promedio de los mínimos intervalos R-R se mantuvo sin diferencias significativas respecto a la cifra basal (ver Figura 26); esto da evidencia del efecto β 1-antagónico del Atenolol y que se hace más acentuado a medida que progresa el tiempo después de haberlo inyectado en las ratas Wistar-UIS, y a su vez es otra evidencia a favor de que el control rápido del cronotropismo cardiaco se relaciona predominantemente con el sistema parasimpático.

Hallazgos generados del estudio del comportamiento de las ratas en la prueba del Laberinto en Cruz Elevado (LCE).

Nuestra aproximación al fenómeno propuso que la memoria asociada a emociones tiene un componente periférico importante a través de unos órganos y receptores que tienen unas respuestas características ante los estímulos que reciben (de tipo aversivo en el caso del LCE) y que a través del sistema nervioso autónomo (SNA) envían informaciones aferentes que llevan un registro de su estado y que estas informaciones actúan como un refuerzo que ayuda a consolidar en la memoria de largo plazo a ese evento específico; si se ejerce un bloqueo sobre estas aferencias es posible que el resultado fuese una atenuación o la abolición de fenómenos como el OTT que son bien descritos y reproducibles a la vez que se ha evidenciado que persisten en el tiempo, es decir, es un efecto mnemónico pues aparece en los animales expuestos por segunda vez al LCE en un periodo que dura hasta 2 semanas entre la primera y segunda exposición (File, Mabbutt, y Hitchcott 1990; Vargas *et al.* 2006).

En el experimento número 3 etapa 2 se encontraron diferencias en el TBA (absoluto y relativo) en relación al tratamiento y a la sesión experimental, siendo mayor el TBA en el grupo de SS durante la primera sesión que en el grupo AD (Adrenalina) siendo esto lo esperado al administrar un fármaco con efecto de tipo ansiogénico como la Adrenalina, además el TBA en el grupo con SS fue mayor en la sesión 1 que en la 2 (ver Tablas 18 y 19).

El parámetro de EBA (absoluto y relativo) en el grupo al que se administró Adrenalina no tuvo diferencias significativas al comparar este indicador entre ambas sesiones lo cual es concordante con el resultado esperado al administrar un fármaco que tiene efecto tipo ansiogénico en dosis altas y puede estar generando interferencia en la consolidación, mientras que en el grupo al que no se le inyectó fármaco (SS) sí presentó diferencias significativas entre ambas sesiones siendo mayor las EBA en la primera sesión. En conjunto, estos hallazgos orientan en la misma dirección que va la presentación de un fenómeno dependiente de la memoria llamado “One Trial Tolerance”, en el cual ocurre una disminución sistemática de los parámetros de EBA y TBA (absolutos y relativos) en la segunda sesión después de haber sometido las ratas al laberinto en cruz elevado; en el grupo de SS, cuando se evaluó con mayor detalle las EBA por sectores en que fue dividido el BA se observó que las entradas al lugar 5 fueron mayores que en el lugar 7 en ambas sesiones, esto podría utilizarse como un posible indicador de la evaluación del riesgo que hace la rata cuando va a explorar el brazo abierto (ver Figuras 18 y 19) y fue un hallazgo similar al del experimento número 4 en donde también siempre hubo mayor EBA y TBA (absolutos y relativos) en el lugar 5 comparado con los demás lugares del BA (ver Tabla 28). A diferencia del experimento número 3 en donde no se utilizaron fármacos ansiolíticos, en el experimento número 4 las EBA y TBA fueron menores en el grupo tratado con SS (ver Tabla 28).

En el experimento número 3 no hubo diferencias en el comportamiento exploratorio en ambas sesiones y esto da evidencia al hecho que no hubo diferencias entre los grupos que indicaran algún sesgo dependiente de los animales, fármacos o la prueba en sí misma. En el experimento número 4 las ratas tuvieron comportamiento exploratorio similar durante la primera sesión (S1) pero en la segunda estuvo notablemente disminuido para todos los grupos excepto el de Midazolam + Atenolol (ver Figura 27). A partir de este parámetro se puede evaluar el efecto mnemónico del laberinto ya que la prueba en sí misma genera un estado de ansiedad en el animal de experimentación, esto le genera un estímulo para codificar y fijar de forma más intensa la experiencia que está viviendo en el laberinto en sus sistemas de memoria asociada a emociones y en la próxima ocasión en que sea expuesto a la prueba los circuitos de evocación de la memoria pondrán presente el estado emocional que tuvo el animal con la primera sesión de la prueba y producirán un repertorio de respuestas “defensivas” (“evitativas”) que le harán explorar menos el laberinto y visitar menos los brazos abiertos; es por este mecanismo que usualmente en la sesión 2 hay disminución de entradas y

tiempo en los BA en las ratas sometidas a la prueba, así mismo en la actividad locomotora. En el presente trabajo, en el grupo MA no se evidenció este fenómeno en la segunda exposición al laberinto mientras que en los demás sí ocurrió.

Se ha descrito la existencia de un fenómeno particular llamado *One Trial Tolerance* (**OTT**) (tolerancia por la primera prueba) descrito inicialmente por File y sus colaboradores (File 1990; File, Mabbutt, y Hitchcott 1990). El OTT consiste en que al utilizar fármacos de tipo ansiolítico como las benzodiazepinas (Diazepam, Midazolam, etc.) inyectados a los animales antes de ser sometidos por primera vez al LCE se obtiene un efecto de tipo ansiolítico pues aumenta la actividad locomotora, las salidas al BA (absolutas y relativas) y el tiempo transcurrido (absoluto y relativo) en el BA cuando se les compara con animales que sólo reciben el vehículo inyectado, pero cuando se reexpone a estos animales al laberinto previa aplicación de la benzodiazepina disminuyen notoriamente la actividad locomotora, las salidas al BA y el tiempo transcurrido en el BA a un nivel similar al de los animales que fueron inyectados con vehículo en la primera sesión. Se han hecho hipótesis variadas sobre el origen del OTT y hasta el momento no ha habido datos concluyentes que soporten las diferentes teorías que se han construido a partir de datos experimentales (Bertoglio y Carobrez 2002a; Calzavara *et al.* 2005; Cruz-Morales, Santos, y Brandao 2002).

En los experimentos realizados en el presente trabajo se evidenció la evidencia del OTT en el experimento 3 etapa 2 donde se administró un fármaco activador del sistema nervioso autónomo (Adrenalina), el cual se inyectó “apostándole” a obtener efecto de tipo ansiogénico, se evidenció disminución de los parámetros (absolutos y relativos) en el grupo tratado con Adrenalina en la primera sesión respecto al de SS tanto para el TBA (ver Tablas 18 y 19) como para las EBA (ver Figuras 18 y 19); en la segunda sesión hubo disminución significativa de TBA (absolutas y relativas) en el grupo tratado con SS que evidencia la ocurrencia del OTT (ibíd. en Tablas), mientras que en las EBA pese a que no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos se observó disminución significativa de estas (absoluto y relativo) en el grupo de SS respecto a lo registrado en la primera sesión (ibíd. en Figuras), el grupo de AD no tuvo diferencias pareadas en ambas sesiones; el comportamiento exploratorio fue similar para ambos grupos en ambas sesiones.

Así mismo, en el experimento 4 etapa 2 se observó ocurrencia del OTT el cual se demostró por la disminución significativa de TBA (absoluto y relativo) en la sesión 2 respecto a la 1 para los grupos SS, SA y SM mientras que no hubo diferencia en el grupo MA (ver Tabla 29 y Figura 28); con relación al EBA (absoluto y relativo) hubo disminución significativa en la sesión 2 respecto a la 1 para los grupos SS y SM lo cual es clara evidencia del OTT, el grupo SA no tuvo diferencias significativas pese a que el EBA absoluto tuvo valor límite y en el grupo MA no hubo diferencias lo cual es franca evidencia de la abolición del fenómeno de OTT en dicho grupo (ver Tabla 29 y Figura 29). La actividad

locomotora fue similar entre los grupos durante la primera sesión, pero hubo diferencia significativa en el grupo MA en la sesión 2 en la que fue mayor a la de los otros grupos, esto a consecuencia del efecto amnésico ejercido por la combinación farmacológica que produjo una atenuación de las aferencias del sistema nervioso autónomo periférico sobre los circuitos de memoria asociada a emociones creando una interferencia en los procesos de memoria emocional, de forma que al existir una mayor actividad motora habrá una mayor tendencia exploratoria y por lo tanto derivará en una mayor exploración de los brazos abiertos (Carobrez y Bertoglio 2005).

Sobre el mecanismo de interferencia en la memoria emocional, este puede relacionarse posiblemente con la modificación de la activación de la amígdala, estructura fuertemente relacionada con la codificación de la memoria emocional ya que interviene en la ponderación de la severidad de los estímulos aversivos (Tomaz *et al.* 1991; Tomaz *et al.* 1992; Tomaz *et al.* 1993) creando y orquestando un “torrente de colorido emocional” en cada una de las diferentes experiencias que puede tener un individuo (Tomaz, Frank, y Conde 2003), estructura misma que está interconectada con núcleos centrales de control del sistema nervioso autónomo (Kandel *et al.* 1999c) y que puede estar ponderando las aferencias que recibe de dichos núcleos dentro del proceso de codificación de la memoria asociada a emociones.

Con los resultados del presente experimento podemos concluir que el bloqueo del sistema nervioso autónomo periférico ejerce un efecto atenuador en la memoria de eventos de contenido emocional, en este caso aversivos porque el LCE es un modelo estático de ansiedad generalizada en el que se somete a los animales a una prueba en que la tendencia filogenética de los mismos (en este caso, ratas) es a permanecer en los brazos cerrados. Esta atenuación de la memoria asociada a emociones (miedo) se evidencia en la marcada diferencia en los diferentes parámetros emocionales evaluados (EBA y TBA, absolutos y relativos) en los grupos de experimentación donde el grupo de Midazolam + Atenolol mostró abolición del OTT mientras que en los tres restantes se presentó el fenómeno tal como se ha descrito en la literatura científica (ver Figuras 28 y 29).

9. CONCLUSIONES

Los hallazgos del presente trabajo de tesis apoyan fuertemente la teoría de James y Lange que da un papel preponderante al origen periférico de la memoria asociada a emociones, al ser bloqueadas estas señales que se integran en los circuitos de memoria se produce un efecto de tipo amnésico sobre el evento aversivo, como el que fue observado en el grupo de Atenolol más Midazolam donde el bloqueo del sistema nervioso autónomo periférico adicional a la benzodiazepina produjo abolición del fenómeno de “*One Trial Tolerance*” por medio de un efecto atenuador en la memoria de eventos de contenido emocional medidos a través de la prueba del laberinto en cruz elevado, a diferencia de evidencias previas que utilizaron β -bloqueadores que atravesaban fácilmente la barrera hematoencefálica y de los cuales se han reportado efectos de la intervención farmacológica a nivel celular de neuronas hipocampales en relación a cambios de la membrana, expresión de genes y otros fenómenos relacionados.

La administración de Adrenalina ejerció efecto ansiogénico en la primera sesión de la prueba del LCE al ser evaluado por el TBA, no se hallaron diferencias significativas en EBA pero el valor de la prueba fue limítrofe y es posible que con poblaciones mayores se pueda esclarecer este aspecto; muy posiblemente el LCE sea sensible a un efecto ansiogénico de la Adrenalina a través de la activación periférica del sistema nervioso autónomo ya que esta es una molécula polar y no atraviesa la barrera hematoencefálica.

La administración intraperitoneal de Midazolam ejerció un efecto de tipo parasimpaticolítico en la regulación de la frecuencia cardiaca de las ratas, las evidencias previas inclinan la balanza hacia un efecto en sitios centrales del sistema nervioso como el causante de este hallazgo; no obstante, hay incertidumbre sobre el punto crítico que genera este hallazgo.

El análisis de variabilidad de la frecuencia cardiaca en el electrocardiograma provee herramientas sensibles que permitieron el descubrimiento de parámetros útiles para la medición de diferencias entre grupos de tratamiento, estado de activación del sistema simpático y parasimpático, creación de perfiles de efecto farmacológico que pueden representarse gráficamente dando una información más detallada y la detección de cambios a corto y largo plazo entre los grupos de tratamiento.

Finalmente, las herramientas de análisis de variabilidad aplicado a variables comportamentales derivadas del estudio del LCE con programas como el PROSTCOM pueden ayudar a construir modelos computadorizados con la finalidad de explicar los hallazgos obtenidos con el modelo animal.

10. RECOMENDACIONES

Aplicando el análisis de variabilidad sobre la evaluación comportamental se observaron algunos hallazgos prometedores que pueden cimentar la construcción de modelos probabilísticos para el análisis y simulación de experimentos sobre el LCE cuando se hayan logrado más avances en el análisis y la interpretación de estos resultados, entre estos análisis adicionales pueden tenerse el análisis de riesgos (*hazard ratio*) y los otros modelos como los análisis de fractales y entropía.

El análisis de variabilidad de la frecuencia cardiaca en el electrocardiograma provee herramientas útiles para evidenciar diferencias entre grupos y es un conjunto de evaluaciones que merece exploraciones adicionales para establecer criterios más detallados que se corresponden a los diferentes estados de activación emocional en la prueba del laberinto en cruz elevado, además puede aplicarse para otros modelos de evaluación comportamental.

11. PERSPECTIVAS

Esta serie de experimentos abre un amplio panorama para investigaciones posteriores sobre la misma línea de trabajo en relación a la profundización del conocimiento en tópicos interesantes como los que se presentan a continuación:

En primera instancia es notorio el efecto parasimpaticolítico del Midazolam que ha sido someramente referenciado en algunos trabajos de anestesiólogos dentro de su práctica clínica; el Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Industrial de Santander actualmente emprende algunos trabajos para esclarecer la farmacodinámica y aproximarse al posible sitio donde se puede estar produciendo este efecto.

Dado que hay evidencias previas que señalan que el atenolol administrado fuera del cerebro probablemente no interviene en el efecto tipo ansiolítico que se logra con un agonista GABA (muscimol) inyectado en el hipotálamo dorsomedial de la rata, ante esto es imperativo determinar a nivel molecular si este β -bloqueador no interviene al utilizarlo en conjunto con benzodiazepinas pues los experimentos previos referenciados hicieron uso del atenolol con atropina intraperitoneal y el muscimol intracerebral.

Con relación al grupo de herramientas de análisis de variabilidad de las señales fisiológicas y electrocardiográficas en ratas se pueden proponer nuevos trabajos que permitan un afinamiento de los parámetros de medición y análisis para de esta forma esclarecer cuáles tienen valor fisiológico significativo, cuáles pueden relacionarse con ciertos eventos fisiológicos o del ciclo circadiano, cuáles pueden ser indicadores de enfermedad o que detecten factores de riesgo o protección ante un determinado evento e incluso puedan predecir la ocurrencia de un estado comportamental, fisiológico o de enfermedad entre otras posibles aplicaciones que pueden llegar a lograrse a través de la adaptación a los experimentos que se llegasen a plantear.

Las mediciones de parámetros fisiológicos y electrocardiográficos brindan unos parámetros adicionales para el análisis comportamental de la prueba del laberinto en cruz elevado; en el futuro pueden construirse dispositivos que permitan la adquisición telemétrica de estas señales en los protocolos experimentales y que puedan generar nuevos hallazgos de los fenómenos que suceden en el animal de experimentación mientras es sometido a la prueba.

12. REFERENCIAS

- Abe, Y., A. Tamura, and M. Nasu. 2002. Effect of preinfarction angina on heart rate variability in the early phase of the first anterior wall acute myocardial infarction. *Circ.J.* 66, no. 5:431-434.
- Abrahamsson, T., E. Lignell, A. Mikulski, S. G. Olovson, and C. G. Regardh. 1989. Central nervous system kinetics of atenolol and metoprolol in the dog during long term treatment. *Drug Metab Dispos.* 17, no. 1:82-86.
- Adinoff, B., I. Mefford, R. Waxman, and M. Linnoila. 1992. Vagal tone decreases following intravenous diazepam. *Psychiatry Res.* 41, no. 2:89-97.
- Agon, P., P. Goethals, Haver D. Van, and J. M. Kaufman. 1991. Permeability of the blood-brain barrier for atenolol studied by positron emission tomography. *J.Pharm.Pharmacol.* 43, no. 8:597-600.
- Aguado, L. 2002. [Cognitive processes and emotional brain systems]. *Rev.Neurol.* 34, no. 12:1161-1170.
- Ainsworth, B. E., W. L. Haskell, M. C. Whitt, M. L. Irwin, A. M. Swartz, S. J. Strath, W. L. O'Brien et al. 2000. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med.Sci.Sports Exerc.* 32, no. 9 Suppl:S498-S504.
- Akselrod, S., D. Gordon, J. B. Madwed, N. C. Snidman, D. C. Shannon, and R. J. Cohen. 1985. Hemodynamic regulation: investigation by spectral analysis. *Am.J.Physiol* 249, no. 4 Pt 2:H867-H875.
- Akselrod, S., D. Gordon, F. A. Ubel, D. C. Shannon, A. C. Berger, and R. J. Cohen. 1981. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 213, no. 4504:220-222.
- Albarracin, A. L., F. D. Farfan, C. J. Felice, and E. E. Decima. 2006. Texture discrimination and multi-unit recording in the rat vibrissal nerve. *BMC.Neurosci.* 7:42.
- American Psychiatric Association. 2000. *Electronic DSM-IV-TR plus*. Washington, D.C: American Psychiatric Association.

Ammassari-Teule, M., F. Pavone, C. Castellano, and J. L. McGaugh. 1991. Amygdala and dorsal hippocampus lesions block the effects of GABAergic drugs on memory storage. *Brain Res.* 551, no. 1-2:104-109.

Aubert, A. E., D. Ramaekers, F. Beckers, R. Breem, C. Deneff, Werf F. Van de, and H. Ector. 1999. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. *Comput.Methods Programs Biomed.* 60, no. 3:197-213.

Baddeley, A. Working Memory. En: *The cognitive neurosciences.* ed. Gazzaniga, M. S. Cambridge, Massachusetts: MIT Press; 1995. pp. 755-764.

----- . 2001. The concept of episodic memory. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 356, no. 1413:1345-1350.

Baddeley, Alan D. 1999. *Memoria humana: teoría y práctica.* Madrid etc: McGraw Hill.

Beckers, F., B. Verheyden, D. Ramaekers, B. Swynghedauw, and A. E. Aubert. 2006. Effects of autonomic blockade on non-linear cardiovascular variability indices in rats. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 33, no. 5-6:431-439.

Berger, R. D., J. P. Saul, and R. J. Cohen. 1989. Transfer function analysis of autonomic regulation. I. Canine atrial rate response. *Am.J.Physiol* 256, no. 1 Pt 2:H142-H152.

Berntson, G. G., M. Sarter, and J. T. Cacioppo. 2003. Ascending visceral regulation of cortical affective information processing. *Eur.J.Neurosci.* 18, no. 8:2103-2109.

Bertoglio, L. J. and A. P. Carobrez. 2002a. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 73, no. 4:963-969.

----- . 2002b. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behav.Brain Res.* 132, no. 2:135-143.

----- . 2002c. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 72, no. 1-2:449-455.

Bihler, I., P. C. Sawh, and I. G. Sloan. 1978. Dual effect of adrenalin on sugar transport in rat diaphragm muscle. *Biochim.Biophys.Acta* 510, no. 2:349-360.

Blanchard, D. C. and R. J. Blanchard. 1988. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu.Rev.Psychol.* 39:43-68.

Boettger, S., D. Hoyer, K. Falkenhahn, M. Kaatz, V. K. Yeragani, and K. J. Bar. 2006. Altered diurnal autonomic variation and reduced vagal information flow in acute schizophrenia. *Clin.Neurophysiol.* 117, no. 12:2715-2722.

Botelho, S., C. Estanislau, and S. Morato. 2007. Effects of under- and overcrowding on exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behav.Processes* 74, no. 3:357-362.

Botelho, S., L. Martínez, C. Conde, E. Prada, and C. Tomaz. 2004. Evaluación de la memoria declarativa asociada con contenido emocional en una muestra colombiana. *Revista Latinoamericana de Psicología* 36, no. 2:229-242.

Buchanan, L. M., M. Cowan, R. Burr, C. Waldron, and H. Kogan. 1993. Measurement of recovery from myocardial infarction using heart rate variability and psychological outcomes. *Nurs.Res.* 42, no. 2:74-78.

Bueno, C. H., H. Zangrossi, Jr., and M. B. Viana. 2005. The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 38, no. 11:1697-1701.

Burgess, N., S. Becker, J. A. King, and J. O'Keefe. 2001. Memory for events and their spatial context: models and experiments. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 356, no. 1413:1493-1503.

Cahill, L. and J. L. McGaugh. 1998. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci.* 21, no. 7:294-299.

Cahill, L., B. Prins, M. Weber, and J. L. McGaugh. 1994. Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. *Nature* 371, no. 6499:702-704.

Calzavara, M. B., C. L. Patti, G. B. Lopez, V. C. Abilio, R. H. Silva, and R. Frussa-Filho. 2005. Role of learning of open arm avoidance in the phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in mice. *Life Sci.* 76, no. 19:2235-2246.

Cannon, Walter B. 1932. *The wisdom of the body*. New York: W.W. Norton & Company, Inc.

Cardenas, F., M. R. Lamprea, and S. Morato. 2001. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behav.Brain Res.* 122, no. 2:169-174.

Carlson, Neil R. *et al.* La teoría de James-Lange. En: *Fisiología de la conducta*. 8 ed. Madrid: Pearson-Addison Wesley; 2005a. pp. 407-410.

Carlson, Neil R. *et al.* Las emociones como patrones de respuesta. En: *Fisiología de la conducta*. 8 ed. Madrid: Pearson-Addison Wesley; 2005b. pp. 378-396.

Carobrez, A. P. and L. J. Bertoglio. 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 29, no. 8:1193-1205.

Carpeggiani, C., M. Emdin, F. Bonaguidi, P. Landi, C. Michelassi, M. G. Trivella, A. Macerata, and A. L'Abbate. 2005. Personality traits and heart rate variability predict long-term cardiac mortality after myocardial infarction. *Eur.Heart J.* 26, no. 16:1612-1617.

Carvalho, M. C., L. brechet-Souza, S. Masson, and M. L. Brandao. 2005. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 38, no. 12:1857-1866.

Castellano, C. *et al.* GABAergic modulation of memory. En: *The biology of memory*. eds. Squire, Larry R. y Elke Lindenlaub. Stuttgart: F.K. Schattauer: Verlag.; 1990. pp. 361-378.

Castellano, C., I. B. Introini-Collison, F. Pavone, and J. L. McGaugh. 1989. Effects of naloxone and naltrexone on memory consolidation in CD1 mice: involvement of GABAergic mechanisms. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 32, no. 2:563-567.

Cerutti, C., M. P. Gustin, C. Z. Paultre, M. Lo, C. Julien, M. Vincent, and J. Sassard. 1991. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am.J.Physiol* 261, no. 4 Pt 2:H1292-H1299.

Clark, K. B., D. C. Smith, D. L. Hassert, R. A. Browning, D. K. Naritoku, and R. A. Jensen. 1998. Posttraining electrical stimulation of vagal afferents with concomitant

vagal efferent inactivation enhances memory storage processes in the rat. *Neurobiol.Learn.Mem.* 70, no. 3:364-373.

Clayton, E. C. and C. L. Williams. 2000. Noradrenergic receptor blockade of the NTS attenuates the mnemonic effects of epinephrine in an appetitive light-dark discrimination learning task. *Neurobiol.Learn.Mem.* 74, no. 2:135-145.

Coderre, T. J. and G. B. Rollman. 1984. Stress analgesia: effects of PCPA, yohimbine, and naloxone. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 21, no. 5:681-686.

Conde, C., C. Tomaz, and S. Botelho. 2001a. Papel de la amígdala en la ponderación de la severidad del estímulo aversivo: su relación con la memoria emocional en modelos comportamentales. *Salud UIS* 33:245-259.

Conde, C. A., J. O. Ayala, S. Botelho, A. B. Herrera, and M. C. Velásquez. 2001b. La vía visual puede ser el disparador de ansiogenicidad en el modelo del laberinto en cruz elevado. *Salud UIS* 33:191-196.

Conde, C. A., V. Costa, and C. Tomaz. 2000. PROSTCOM: un conjunto de programas para registro y procesamiento de datos comportamentales en investigaciones de fisiología y farmacología. *Biotemas* 13:145-159.

Cristea, A., S. Negres, and D. Joean. 1995. The double-way effects of naloxone and clonidine on experimental stress analgesia. *Rom.J.Physiol* 32, no. 1-4:137-143.

Critchley, H. D., P. Rotshtein, Y. Nagai, J. O'Doherty, C. J. Mathias, and R. J. Dolan. 2005. Activity in the human brain predicting differential heart rate responses to emotional facial expressions. *Neuroimage.* 24, no. 3:751-762.

Cruz, A. P., F. Frej, and F. G. Graeff. 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 49, no. 1:171-176.

Cruz-Morales, S. E., N. R. Santos, and M. L. Brandao. 2002. One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 72, no. 4:973-978.

Damasio, A. R. 1996. The somatic marker hypothesis and the possible functions of the prefrontal cortex. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 351, no. 1346:1413-1420.

- Damasio, H., T. J. Grabowski, D. Tranel, R. D. Hichwa, and A. R. Damasio. 1996. A neural basis for lexical retrieval. *Nature* 380, no. 6574:499-505.
- Davis, A. M. and B. H. Natelson. 1993. Brain-heart interactions. The neurocardiology of arrhythmia and sudden cardiac death. *Tex.Heart Inst.J.* 20, no. 3:158-169.
- Davis, M. 1994. The role of the amygdala in emotional learning. *Int.Rev.Neurobiol.* 36:225-266.
- de Gelder, B. 2006. Towards the neurobiology of emotional body language. *Nat.Rev.Neurosci.* 7, no. 3:242-249.
- de Kloet, C. S., E. Vermetten, E. Geuze, A. Kavelaars, C. J. Heijnen, and H. G. Westenberg. 2006. Assessment of HPA-axis function in posttraumatic stress disorder: pharmacological and non-pharmacological challenge tests, a review. *J.Psychiatr.Res.* 40, no. 6:550-567.
- de Kloet, E. R., M. Joels, and F. Holsboer. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat.Rev.Neurosci.* 6, no. 6:463-475.
- de Lange, E. C., M. B. Hesselink, M. Danhof, A. G. de Boer, and D. D. Breimer. 1995. The use of intracerebral microdialysis to determine changes in blood-brain barrier transport characteristics. *Pharm.Res.* 12, no. 1:129-133.
- Debiec, J., J. E. LeDoux, and K. Nader. 2002. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36, no. 3:527-538.
- Depino, A. M. and C. Gross. 2007. Simultaneous assessment of autonomic function and anxiety-related behavior in BALB/c and C57BL/6 mice. *Behav.Brain Res.* 177, no. 2:254-260.
- DiMicco, J. A. 1987. Evidence for control of cardiac vagal tone by benzodiazepine receptors. *Neuropharmacology* 26, no. 6:553-559.
- Dishman, R. K., Y. Nakamura, M. E. Garcia, R. W. Thompson, A. L. Dunn, and S. N. Blair. 2000. Heart rate variability, trait anxiety, and perceived stress among physically fit men and women. *Int.J.Psychophysiol.* 37, no. 2:121-133.
- Dudai, Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu.Rev.Psychol.* 55:51-86.

Elder, A., J. P. Couderc, R. Gelein, S. Eberly, C. Cox, X. Xia, W. Zareba et al. 2007. Effects of on-road highway aerosol exposures on autonomic responses in aged, spontaneously hypertensive rats. *Inhal.Toxicol.* 19, no. 1:1-12.

Ellsworth, P. C. 1994. William James and emotion: is a century of fame worth a century of misunderstanding? *Psychol.Rev.* 101, no. 2:222-229.

Escarabajal, M. D., C. Torres, and C. F. Flaherty. 2003. The phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is abolished by previous administration of chlordiazepoxide or buspirone. *Life Sci.* 73, no. 8:1063-1074.

Fauchier, L., A. Melin, V. Eder, D. Antier, and P. Bonnet. 2006. Heart rate variability in rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Ann.Cardiol.Angeiol.(Paris)* 55, no. 5:249-254.

File, S. E. 1990. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 100, no. 2:281-282.

----- 1993. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behav.Brain Res.* 58, no. 1-2:199-202.

File, S. E., P. S. Mabbutt, and P. K. Hitchcott. 1990. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 102, no. 1:98-101.

File, S. E., L. J. Wilks, and P. S. Mabbutt. 1988. Withdrawal, tolerance and sensitization after a single dose of lorazepam. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 31, no. 4:937-940.

File, S. E. and H. Zangrossi, Jr. 1993. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology (Berl)* 110, no. 1-2:240-244.

File, S. E., H. Zangrossi, Jr., F. L. Sanders, and P. S. Mabbutt. 1994. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 113, no. 3-4:543-546.

File, S. E., H. Zangrossi, Jr., M. Viana, and F. G. Graeff. 1993. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology (Berl)* 111, no. 4:491-494.

- Frank, J. E. and C. Tomaz. 2000. Enhancement of declarative memory associated with emotional content in a Brazilian sample. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 33, no. 12:1483-1489.
- Friedman, B. H. and J. F. Thayer. 1998. Autonomic balance revisited: panic anxiety and heart rate variability. *J.Psychosom.Res.* 44, no. 1:133-151.
- Frussa-Filho, R. and Rde A. Ribeiro. 2002. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is not due to acquisition of a phobic avoidance of open arms during initial exposure. *Life Sci.* 71, no. 5:519-525.
- Furness, J. B. 2006. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. *Auton.Neurosci.* 130, no. 1-2:1-5.
- Ganong, W. F. Origen del latido cardiaco y la actividad electrica del corazón. En: *Fisiología Médica.* eds. Ganong, W. F. y M. A. Castellanos. 20a ed. Mexico: El Manual Moderno; 2006. pp. 513-528.
- Gathercole, S. E. and A. Baddeley. 1990. Phonological memory deficits in language-disordered children: Is there a causal connection? *J.Mem.Lang.* 29:336-360.
- Gathercole, S. E., J. Briscoe, A. Thorn, C. Tiffany, and A. S. Team. 2007. Deficits in verbal long-term memory and learning in children with poor phonological short-term memory skills. *Q.J.Exp.Psychol.(Colchester.):*1.
- Gold, P. E., R. L. Delanoy, and J. Merrin. 1984. Modulation of long-term potentiation by peripherally administered amphetamine and epinephrine. *Brain Res.* 305, no. 1:103-107.
- Goodman, Louis Sanford, Alfred Gilman, Laurence L. Brunton, John S. Lazo, and Keith L. Parker. 2006. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* New York: McGraw-Hill.
- Gorman, A. L. and A. J. Dunn. 1993. Beta-adrenergic receptors are involved in stress-related behavioral changes. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 45, no. 1:1-7.
- Govindan, R. B., C. L. Lowery, J. Q. Campbell, T. H. Best, P. Murphy, H. T. Preissl, and H. Eswaran. 2007. Early maturation of sinus rhythm dynamics in high-risk fetuses. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 196, no. 6:572-577.

Gray, M. A., N. A. Harrison, S. Wiens, and H. D. Critchley. 2007. Modulation of emotional appraisal by false physiological feedback during fMRI. *PLoS.ONE*. 2, no. 6:e546.

Griebel, G., J. Moreau, F. Jenck, R. J. Martin, and G. Misslin. 1993. Some critical determinants of the behavior of rats in the elevated plus-maze. *Behav.Proc.* 29:37-48.

Hainsworth, R. Physiology of the cardiac autonomic system. En: Clinical Guide to Cardiac Autonomic Tests. ed. Malik, M. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1998. pp. 3-28.

Hansen, A. L., B. H. Johnsen, J. J. Sollers, III, K. Stenvik, and J. F. Thayer. 2004. Heart rate variability and its relation to prefrontal cognitive function: the effects of training and detraining. *Eur.J.Appl.Physiol* 93, no. 3:263-272.

Hansen, A. L., B. H. Johnsen, and J. F. Thayer. 2003. Vagal influence on working memory and attention. *Int.J.Psychophysiol.* 48, no. 3:263-274.

Hartikainen, J. *et al.* Short-Term measurement of Heart Rate Variability. En: Clinical guide to cardiac autonomic tests. ed. Malik, M. 1 ed. Dordrecht, The Netherlands.: Kluwer Academic Publishers; 1998. pp. 149-176.

Hascoet, M., M. Bourin, and Tertre A. Couetoux du. 1997. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 58, no. 4:1131-1138.

Haulica, I., A. Busuioc, C. Neamtu, V. Dorneanu, G. Titu, and A. Spac. 1995. Possible involvement of the L-arginine-nitric oxide pathway in the modulation of stress-induced analgesia. *Funct.Neurol.* 10, no. 4-5:169-173.

Holmes, A., J. P. Iles, S. J. Mayell, and R. J. Rodgers. 2001. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behav.Brain Res.* 122, no. 2:159-167.

Howarth, F. C., M. Jacobson, M. Shafiullah, and E. Adeghate. 2005. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Exp.Physiol* 90, no. 6:827-835.

Hyman, S. E. 1998. A new image for fear and emotion. *Nature* 393, no. 6684:417-418.

Introini-Collison, I. B., C. Dalmaz, and J. L. McGaugh. 1996. Amygdala beta-noradrenergic influences on memory storage involve cholinergic activation. *Neurobiol.Learn.Mem* 65, no. 1:57-64.

Introini-Collison, I. B., B. Miyazaki, and J. L. McGaugh. 1991. Involvement of the amygdala in the memory-enhancing effects of clenbuterol. *Psychopharmacology (Berl)* 104, no. 4:541-544.

Introini-Collison, I. B., A. H. Nagahara, and J. L. McGaugh. 1989. Memory enhancement with intra-amygdala post-training naloxone is blocked by concurrent administration of propranolol. *Brain Res.* 476, no. 1:94-101.

Izquierdo, I. and M. Graudenz. 1980. Memory facilitation by naloxone is due to release of dopaminergic and beta-adrenergic systems from tonic inhibition. *Psychopharmacology (Berl)* 67, no. 3:265-268.

Kalueff, A. V. 2007. Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. *Neural Plast.:*78171.

Kandel, E. *et al.* Aprendizaje y Memoria. En: Neurociencia y conducta. 2 ed. Madrid: Prentice Hall; 1999a. pp. 695-713.

Kandel, E. *et al.* Estados Emocionales. En: Neurociencia y conducta. 2 ed. Madrid: Prentice Hall; 1999b. pp. 635.

Kandel, E., J. Schwartz, y T Jessell. Interconexiones de la amígdala. Neurociencia y conducta. 2[32], 650. 1999c. Madrid, Prentice Hall.
Ref Type: Art Work

Koizumi, K. y C. Brooks. El sistema nervioso autónomo y su papel en el control de las actividades viscerales. En: Fisiología Médica. ed. Mountcastle, Vernon B. 2th ed ed. St. Louis: The C.V. Mosby; 1980. pp. 741-768.

Kuo, T. B. and C. C. Yang. 2004. Scatterplot analysis of EEG slow-wave magnitude and heart rate variability: an integrative exploration of cerebral cortical and autonomic functions. *Sleep* 27, no. 4:648-656.

Kurihara, A., H. Suzuki, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga, and M. Hanano. 1987. Uptake of propranolol by microvessels isolated from bovine brain. *J.Pharm.Sci.* 76, no. 10:759-764.

- Kuznetsov, S. V., R. O. Jenkins, and N. V. Goncharov. 2007. Electrophysiological study of infant and adult rats under acute intoxication with fluoroacetamide. *J.Appl.Toxicol.* 27, no. 6:538-550.
- Labar, K. S. and R. Cabeza. 2006. Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nat.Rev.Neurosci.* 7, no. 1:54-64.
- Laborit, H. 1975. [Neurophysiological and biological bases of active and passive avoidance behaviors. Somatic consequences. Behavioral level. Semantic problems]. *Ann.Med.Psychol.(Paris)* 1, no. 5:573-603.
- Landen, M., B. Wennerblom, H. Tygesen, K. Modigh, K. Sorvik, C. Ysander, A. Ekman et al. 2004. Heart rate variability in premenstrual dysphoric disorder. *Psychoneuroendocrinology* 29, no. 6:733-740.
- Lavoie, K. L., R. P. Fleet, C. Laurin, A. Arsenault, S. B. Miller, and S. L. Bacon. 2004. Heart rate variability in coronary artery disease patients with and without panic disorder. *Psychiatry Res.* 128, no. 3:289-299.
- LeDoux, J. E. 1993. Emotional memory systems in the brain. *Behav.Brain Res.* 58, no. 1-2:69-79.
- LeDoux, J. E. In search of an emotional system in the brain: Leaping from fear to emotion and consciousness. En: *The cognitive neurosciences*. ed. Gazzaniga, M. S. Cambridge, Massachusetts: MIT Press; 1995. pp. 1049-1061.
- Levy, M. N. 1990. Autonomic interactions in cardiac control. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 601:209-221.
- Liang, K. C., R. G. Juler, and J. L. McGaugh. 1986. Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Res.* 368, no. 1:125-133.
- Liang, K. C. and J. L. McGaugh. 1983. Lesions of the stria terminalis attenuate the amnesic effect of amygdaloid stimulation on avoidance responses. *Brain Res.* 274, no. 2:309-318.
- Mallefet, J. and F. Baguet. 1987. Oxygen consumption and luminescence of Maurolicus photophores stimulated by adrenalin. *Comp Biochem.Physiol C.* 87, no. 2:233-236.

Martinez, J. C., F. Cardenas, M. Lamprea, and S. Morato. 2002. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus-maze. *Behav.Processes* 60, no. 1:15-26.

McAinsh, J. and J. M. Cruickshank. 1990. Beta-blockers and central nervous system side effects. *Pharmacol.Ther.* 46, no. 2:163-197.

McGaugh, J. L. 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287, no. 5451:248-251.

McGaugh, J. L. and L. Cahill. 1997. Interaction of neuromodulatory systems in modulating memory storage. *Behav.Brain Res.* 83, no. 1-2:31-38.

McGaugh, J. L., L. Cahill, and B. Roozendaal. 1996. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, no. 24:13508-13514.

McGaugh, J. L., I. B. Introini-Collison, L. F. Cahill, C. Castellano, C. Dalmaz, M. B. Parent, and C. L. Williams. 1993. Neuromodulatory systems and memory storage: role of the amygdala. *Behav.Brain Res.* 58, no. 1-2:81-90.

McGregor, I. S. and R. A. Dielenberg. 1999. Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 147, no. 2:174-181.

Mietus, J. E., C. K. Peng, I. Henry, R. L. Goldsmith, and A. L. Goldberger. 2002. The pNNx files: re-examining a widely used heart rate variability measure. *Heart* 88, no. 4:378-380.

MONTGOMERY, K. C. and J. A. MONKMAN. 1955. The relation between fear and exploratory behavior. *J.Comp Physiol Psychol.* 48, no. 2:132-136.

Moral, S. 2007. Frecuencia cardiaca, consumo de oxígeno (VO₂) y gasto energético. *Federación Española de Aeróbic y Fitness*, 2007, 1-5.

Moreira, C. M., S. Masson, M. C. Carvalho, and M. L. Brandao. 2007. Exploratory behaviour of rats in the elevated plus-maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and central amygdaloid nuclei. *Brain Res.Bull.* 71, no. 5:466-474.

Morris, R. W., R. F. Westbrook, and A. S. Killcross. 2005. Reinstatement of extinguished fear by beta-adrenergic arousal elicited by a conditioned context. *Behav. Neurosci.* 119, no. 6:1662-1671.

Mountcastle, Vernon B. Integración neural de la somestesia. En: Fisiología Médica. 2th ed ed. St. Louis: The C.V. Mosby; 1980. pp. 291-329.

Muller, U., E. Mottweiler, and P. Bublak. 2005. Noradrenergic blockade and numeric working memory in humans. *J. Psychopharmacol.* 19, no. 1:21-28.

Natelson, B. H. 1985. Neurocardiology. An interdisciplinary area for the 80s. *Arch. Neurol.* 42, no. 2:178-184.

O'Carroll, R. E., E. Drysdale, L. Cahill, P. Shajahan, and K. P. Ebmeier. 1999a. Memory for emotional material: a comparison of central versus peripheral beta blockade. *J. Psychopharmacol.* 13, no. 1:32-39.

----- 1999b. Stimulation of the noradrenergic system enhances and blockade reduces memory for emotional material in man. *Psychol. Med.* 29, no. 5:1083-1088.

Pagani, M., F. Lombardi, and A. Malliani. 1993. Heart rate variability: disagreement on the markers of sympathetic and parasympathetic activities. *J. Am. Coll. Cardiol.* 22, no. 3:951-953.

Pardridge, W. M., R. Sakiyama, and G. Fierer. 1984. Blood-brain barrier transport and brain sequestration of propranolol and lidocaine. *Am. J. Physiol* 247, no. 3 Pt 2:R582-R588.

Pellow, S., P. Chopin, S. E. File, and M. Briley. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, no. 3:149-167.

Pellow, S. and S. E. File. 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, no. 3:525-529.

Pesold, C. and D. Treit. 1994. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res.* 638, no. 1-2:295-301.

Petit-Demouliere, B. and M. Bourin. 2007. Temporal parameters of one-trial tolerance to benzodiazepines in four-plate test-retest. *Behav.Brain Res.* 183, no. 2:222-225.

Petit-Demouliere, B., M. Hascoet, and M. Bourin. 2007. Factors triggering abolishment of benzodiazepines effects in the four-plate test-retest in mice. *Eur.Neuropsychopharmacol.*

Phelps, E. A. and J. E. LeDoux. 2005. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* 48, no. 2:175-187.

Pieper, S., J. F. Brosschot, Leeden R. van der, and J. F. Thayer. 2007. Cardiac Effects of Momentary Assessed Worry Episodes and Stressful Events. *Psychosom.Med.*

Pollatos, O., W. Kirsch, and R. Schandry. 2005. On the relationship between interoceptive awareness, emotional experience, and brain processes. *Brain Res.Cogn Brain Res.* 25, no. 3:948-962.

Pomeranz, B., R. J. Macaulay, M. A. Caudill, I. Kutz, D. Adam, D. Gordon, K. M. Kilborn et al. 1985. Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *Am.J.Physiol* 248, no. 1 Pt 2:H151-H153.

Ponard, J. G., A. A. Kondratyev, and J. P. Kucera. 2007. Mechanisms of intrinsic beating variability in cardiac cell cultures and model pacemaker networks. *Biophys.J.* 92, no. 10:3734-3752.

Ponikowski, P., S. D. Anker, T. P. Chua, R. Szelemej, M. Piepoli, S. Adamopoulos, K. Webb-Peploe et al. 1997. Depressed heart rate variability as an independent predictor of death in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am.J.Cardiol.* 79, no. 12:1645-1650.

Power, A. E., L. J. Thal, and J. L. McGaugh. 2002. Lesions of the nucleus basalis magnocellularis induced by 192 IgG-saporin block memory enhancement with posttraining norepinephrine in the basolateral amygdala. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, no. 4:2315-2319.

Randall, W. C. y J. L. Ardell. Funtional anatomy of the cardiac efferent innervation. En: Neurocardiology. eds. Kulbertus, H. E. y G. Franck.Mount Kisco: Futura; 1988. pp. 3-24.

- Redondo, M. and F. Del Valle-Inclán. 1992. Decrements in heart rate variability during memory search. *Int.J.Psychophysiol.* 13, no. 1:29-35.
- Rex, A. and H. Fink. 1998. Effects of cholecystinin-receptor agonists on cortical 5-HT release in guinea pigs on the X-maze. *Peptides* 19, no. 3:519-526.
- Rex, A., C. A. Marsden, and H. Fink. 1993. Effect of diazepam on cortical 5-HT release and behaviour in the guinea-pig on exposure to the elevated plus maze. *Psychopharmacology (Berl)* 110, no. 4:490-496.
- Rodgers, R. J., B. J. Cao, A. Dalvi, and A. Holmes. 1997. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 30, no. 3:289-304.
- Rodgers, R. J. and A. Dalvi. 1997. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 21, no. 6:801-810.
- Rowan, W. H., III, M. J. Campen, L. B. Wichers, and W. P. Watkinson. 2007. Heart rate variability in rodents: uses and caveats in toxicological studies. *Cardiovasc.Toxicol.* 7, no. 1:28-51.
- Salasoo, A., R. M. Shiffrin, and T. C. Feustel. 1985. Building permanent memory codes: codification and repetition effects in word identification. *J.Exp.Psychol.Gen.* 114, no. 1:50-77.
- Salinas, J. A. and J. L. McGaugh. 1996. The amygdala modulates memory for changes in reward magnitude: involvement of the amygdaloid GABAergic system. *Behav.Brain Res.* 80, no. 1-2:87-98.
- Salum, C., A. C. Roque-da-Silva, and S. Morato. 2003. Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. *Behav.Processes* 63, no. 2:87-93.
- Schweizer, R., W. T. Roth, and T. Elbert. 1991. Effect of two beta-blockers on stress during mental arithmetic. *Psychopharmacology (Berl)* 105, no. 4:573-577.
- Seely, A. J. and P. T. Macklem. 2004. Complex systems and the technology of variability analysis. *Crit Care* 8, no. 6:R367-R384.
- Shekhar, A. 1993. GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. *Brain Res.* 627, no. 1:9-16.

- Shekhar, A., L. S. Sims, and R. R. Bowsher. 1993. GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. II. Physiological measures. *Brain Res.* 627, no. 1:17-24.
- Silva, M. A. and C. Tomaz. 1995. Amnesia after diazepam infusion into basolateral but not central amygdala of *Rattus norvegicus*. *Neuropsychobiology* 32, no. 1:31-36.
- Silvestre, J. S., A. G. Fernandez, and J. M. Palacios. 1999a. Effects of rolipram on the elevated plus-maze test in rats: a preliminary study. *J.Psychopharmacol.* 13, no. 3:274-277.
- 1999b. Preliminary evidence for an involvement of the cholinergic system in the sedative effects of rolipram in rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 64, no. 1:1-5.
- Sloan, I. G., P. C. Sawh, and I. Bihler. 1978. Influence of adrenalin on sugar transport in soleus, a red skeletal muscle. *Mol.Cell Endocrinol.* 10, no. 1:3-12.
- Squire, L. R. 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol.Rev.* 99, no. 2:195-231.
- Squire, L. R., B. Knowlton, and G. Musen. 1993. The structure and organization of memory. *Annu.Rev.Psychol.* 44:453-495.
- Squire, L. R., J. G. Ojemann, F. M. Miezin, S. E. Petersen, T. O. Videen, and M. E. Raichle. 1992. Activation of the hippocampus in normal humans: a functional anatomical study of memory. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, no. 5:1837-1841.
- Sternberg, D. B., P. E. Gold, and J. L. McGaugh. 1982. Noradrenergic sympathetic blockade: lack of effect on memory or retrograde amnesia. *Eur.J.Pharmacol.* 81, no. 1:133-136.
- ston-Jones, G., M. T. Shipley, G. Chouvet, M. Ennis, Bockstaele E. Van, V. Pieribone, R. Shiekhattar et al. 1991. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog.Brain Res.* 88:47-75.
- Svenson, O., I. Salo, and Loo K. van de. 2007. Memories of real-life decisions. *Memory* 15, no. 2:205-220.

Takeuchi, H., A. Enzo, and H. Minamitani. 2001. Circadian rhythm changes in heart rate variability during chronic sound stress. *Med.Biol.Eng Comput.* 39, no. 1:113-117.

Terman, G. W., Y. Shavit, J. W. Lewis, J. T. Cannon, and J. C. Liebeskind. 1984. Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. *Science* 226, no. 4680:1270-1277.

Thayer, J. F. and E. Ruiz-Padial. 2006. Neurovisceral integration, emotions and health: An update. *International Congress Series*, no. 1287:122-127.

Tomaz, C., H. Dickinson-Anson, and J. L. McGaugh. 1991. Amygdala lesions block the amnesic effects of diazepam. *Brain Res.* 568, no. 1-2:85-91.

-----, 1992. Basolateral amygdala lesions block diazepam-induced anterograde amnesia in an inhibitory avoidance task. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, no. 8:3615-3619.

Tomaz, C. and J. C. Costa. 2001. Neurociência e Memória. *Humanidades* 48:145-160.

Tomaz, C., H. Dickinson-Anson, J. L. McGaugh, M. A. Souza-Silva, M. B. Viana, and F. G. Graeff. 1993. Localization in the amygdala of the amnesic action of diazepam on emotional memory. *Behav.Brain Res.* 58, no. 1-2:99-105.

Tomaz, C., J. E. Frank, and C. Conde. 2003. Integrative function of the amygdala in emotional memory storage. *International Congress Series* 1250:335-346.

Tornatzky, W. and K. A. Miczek. 1994. Behavioral and autonomic responses to intermittent social stress: differential protection by clonidine and metoprolol. *Psychopharmacology (Berl)* 116, no. 3:346-356.

Treit, D. and M. Fundytus. 1988. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 31, no. 4:959-962.

Treit, D., J. Menard, and C. Royan. 1993. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 44, no. 2:463-469.

Tulen, J. H., G. Mulder, L. Pepplinkhuizen, Man in 't Veld AJ, H. G. van Steenis, and P. Moleman. 1994. Effects of lorazepam on cardiac vagal tone during rest and

mental stress: assessment by means of spectral analysis. *Psychopharmacology (Berl)* 114, no. 1:81-89.

Tulving, E. Organization of memory: Quo vadis? En: The cognitive neurosciences. ed. Gazzaniga, M. S. Cambridge, Massachusetts: MIT Press; 1995. pp. 839-847.

Uehara, A., C. Kurata, T. Sugi, T. Mikami, and S. Shouda. 1999. Diabetic cardiac autonomic dysfunction: parasympathetic versus sympathetic. *Ann.Nucl.Med.* 13, no. 2:95-100.

van Ravenswaaij-Arts, C. M., L. A. Kollee, J. C. Hopman, G. B. Stoeltinga, and H. P. van Geijn. 1993. Heart rate variability. *Ann.Intern.Med.* 118, no. 6:436-447.

van Stegeren, A. H., W. Everaerd, L. Cahill, J. L. McGaugh, and L. J. Gooren. 1998. Memory for emotional events: differential effects of centrally versus peripherally acting beta-blocking agents. *Psychopharmacology (Berl)* 138, no. 3-4:305-310.

Vargas, K. M., Cunha C. Da, and R. Andreatini. 2006. Amphetamine and pentylenetetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 30, no. 8:1394-1402.

Varty, G. B., C. A. Morgan, M. E. Cohen-Williams, V. L. Coffin, and G. J. Carey. 2002. The gerbil elevated plus-maze I: behavioral characterization and pharmacological validation. *Neuropsychopharmacology* 27, no. 3:357-370.

Vitale, G., R. Arletti, and M. Sandrini. 2005. Acute noise stress analgesia in relation to 5-HT₂ and mu-opioid receptor changes in the frontal cortex of young mice. *Life Sci.* 77, no. 20:2500-2513.

Vogel, L. R., P. R. Muskin, E. D. Collins, and R. P. Sloan. 1996. Lorazepam reduces cardiac vagal modulation in normal subjects. *J.Clin.Psychopharmacol.* 16, no. 6:449-453.

Voss, A., V. Baier, S. Schulz, and K. J. Bar. 2006. Linear and nonlinear methods for analyses of cardiovascular variability in bipolar disorders. *Bipolar.Disord.* 8, no. 5 Pt 1:441-452.

Weiskrantz, L. 1987. Neuroanatomy of memory and amnesia: a case for multiple memory systems. *Hum.Neurobiol.* 6, no. 2:93-105.

Wennerblom, B., L. Lurje, H. Tygesen, R. Vahisalo, and A. Hjalmarson. 2000. Patients with uncomplicated coronary artery disease have reduced heart rate variability mainly affecting vagal tone. *Heart* 83, no. 3:290-294.

Wiltgen, B. J., R. A. Brown, L. E. Talton, and A. J. Silva. 2004. New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. *Neuron* 44, no. 1:101-108.

Yehuda, R. and S. M. Antelman. 1993. Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. *Biol.Psychiatry* 33, no. 7:479-486.

Yildirim, A., O. Soylu, B. Dagdeviren, A. Eksik, and T. Tezel. 2007. Sympathetic overactivity in patients with left ventricular aneurysm in early period after anterior myocardial infarction: does sympathetic activity predict aneurysm formation? *Angiology* 58, no. 3:275-282.

Zupko, I., K. Janossy, K. Maul, A. Marki, and G. Falkay. 2003. Alpha-adrenergic blockade: a possible mechanism of tocolytic action of certain benzodiazepines in a postpartum rat model in vivo. *Life Sci.* 72, no. 10:1093-1102.