

**EFFECTOS COMPORTAMENTALES EN RATAS WISTAR-UIS
RESULTANTES DE DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN AL
LABERINTO EN CRUZ ELEVADO**

Bernardo Rey Moreno

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Bucaramanga
2008**

**EFFECTOS COMPORTAMENTALES EN RATAS WISTAR-UIS
RESULTANTES DE DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN AL
LABERINTO EN CRUZ ELEVADO**

Bernardo Rey Moreno

**Trabajo de Grado para obtener el título de
Biólogo**

Director

**M.D. Carlos Arturo Conde Cotes PhD
Laboratorio de Neurociencias y comportamiento UIS-UPB
Departamento de Ciencias Básicas
Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander**

Codirector

**Maria Carolina Velásquez Martínez, Ft. MSc.
Profesora auxiliar, Sección de Fisiología
Laboratorio de Neurociencias y Comportamiento UIS-UPB
Departamento de Ciencias Básicas
Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander**

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Bucaramanga
2008**

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Carlos Arturo Conde Cotes por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por supuesto las enseñanzas a lo largo de la realización de esta investigación.

A María Carolina Velásquez, aspirante a doctora por todo el apoyo maternal en todo el proceso.

A los profesores de la escuela de biología por su formación y por mantener un nivel competitivo

A Diana por la entrega que muestra en el laboratorio y su apoyo incondicional

A Albert por ser la especie fundadora en el laboratorio de neurociencias.

A pocho por ser un verdadero amigo a lo largo de la carrera y con el cual espero mantener esa bonita amistad

A Mauricio por permitirnos ser parte de su vida, y por su lucha incansable, y su espíritu revolucionario

A Meli y Erika por su amistad, con su compañía el paso por la universidad fue, muy divertido

Por ultimo a mi familia

A mi Papa por el ejemplo de amor, nada de lo que soy ahora pasaría sin el, gracias por amar a mi mama de la forma que lo hiciste.

A la niña más consentida de la casa, mi triunfo es agridulce sin ti mamá, cuando sustente no pensé mas que en ti, porque sabia que estabas conmigo. Desde el cielo se que me continuas amando.

A mi tío Cenen por su particular forma de ver la vida, muy poco sabemos interpretate.

A mi hermano Audi por ser el ejemplo a seguir, por su ayuda económica, que muchas veces me saco de aprietos en la universidad, por la calidad de persona que eres, es muy difícil entre hombres expresar el cariño pero se que lo hacemos de maneras discretas.

A mi hermana Isis le debo muchísimo, jamás he sido capaz de agradecerle todo el apoyo moral, económico..... espero te sientas orgullosa de este triunfo porque haces parte de el.

A mi hermana Hermi: soy tu fan número uno, cuando hablo de mujeres valientes estas en el primer lugar, tu inteligencia y tu amor te ponen en un estatus superior.

A William por haber llegado, haberse quedado, y haber formado una linda familia.

A Edwing por permitirnos hacer parte de su familia, en realidad es una sola familia

A mis sobrinos Milena, Wilson, Geferson, Dani, Santi por su cariño, por su tolerancia, por no permitirme madurar.

A mi hija Angie por todo su amor, corazón este triunfo es para ti.

A una personita que se anclo a mi vida, me mostró el mundo de un color particularmente bello. Mi patuma serás por siempre, no lo dudes jamás.

A una hermosa bebe, te quielo muto.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
1. OBJETIVOS	
1.1 Objetivo General	4
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Material animal	5
2.2 Fármaco	5
2.3 Laberinto en Cruz Elevado	5
2.4 Procedimiento	6
2.5 Análisis Comportamental	7
2.6 Análisis Estadístico	8
2.7 Consideraciones Éticas	8
3. RESULTADOS	
3.1 Tiempo relativo de entradas a brazo abierto %EBA	9
3.2 Tiempo absoluto en brazo abierto (TBA)	10
3.3 Tiempo relativo de permanencia en brazo abierto (%TBA)	10
3.4 Actividad locomotora en general	10
3.5 Tiempo en brazo abierto sesión 1 vs. sesión 2	10
3.6 Análisis minuto a minuto	11
4. DISCUSION	12
5. CONCLUSIONES	15
6. REFERENCIAS	16

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grupos experimentales	20
Tabla 2. Comparación sesión 1 y sesión 2, tiempo en brazo abierto (TBA)	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tiempo de permanencia en BA durante los primeros 5 minutos en la primera sesión	22
Figura 2. Tiempo relativo de entradas a brazo abierto entre tratamientos.	23
Figura 3. Tiempo absoluto en brazo abierto (tiempo en BA)	24
Figura 4. Porcentaje de tiempo en BA (% de tiempo en BA)	25
Figura 5. Numero de cruzamientos	26
Figura 6. Distribución minuto a minuto del Tiempo de permanencia en BA acumulado del tratamiento de 10 minutos en la sesión 1	27

RESUMEN

Titulo*: Efectos comportamentales en ratas Wistar-UIS resultantes de diferentes tiempos de exposición al laberinto en cruz elevado

Autor: Bernardo Rey Moreno**

Palabras clave: "One trial tolerante", laberinto en cruz elevado, trastorno de estrés post-traumático, aprendizaje.

La exposición previa (durante 5 minutos) de la rata al laberinto en cruz elevado, no permite evidenciar el efecto de tipo ansiolítico de las benzodiazepinas, en una segunda sesión. Este fenómeno conocido como "One-trial Tolerance" (OTT), parece estar relacionado con un proceso de aprendizaje aversivo durante la primera sesión. Mediante la utilización de diferentes tiempos de exposición durante la primera sesión se investigó la influencia del tiempo inicial de exposición sobre la aparición y posible eliminación del fenómeno. Los resultados sugieren que las variables comportamentales indicadoras de memoria emocional y de efecto tipo ansiolítico, están asociadas al tiempo de exposición del animal en la primera sesión. Esto se evidencia por la pérdida de la acción ansiolítica del Diazepam en aquellos animales expuestos durante 1 y 5 minutos en la primera sesión, mientras que en aquellos animales expuestos por 10 minutos, se pudo evidenciar el efecto ansiolítico a partir del minuto 8 de la segunda sesión equivalente al minuto 18 acumulado en las dos sesiones. Adicionalmente, los tiempos acumulados en los brazos abiertos en la segunda sesión (ratas controles) en función del tiempo experimental, ajustan a una función lineal continua que podría haber comenzado desde la primera sesión en el LCE. En conjunto, los resultados indican que el fenómeno de OTT podría considerarse como una interferencia del aprendizaje dependiente del tiempo.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Dr. Carlos Arturo Conde Cotes.

Codirector:

Carolina Velásquez.

ABSTRACT

TITLE*: Behavioural effects on Wistar-UIS rats from different exposition times in LCE

Author: Bernardo Rey Moreno**

Key words: "One Trial Tolerance" (OTT), elevated plus maze, learning

Previous rat's expositions (during 5 minutes) to the elevated plus maze (EPM), don't let see the Benzodiazepines anxiolytic effect during a second session. This phenomenon known like "One Trial Tolerance" (OTT) seems to be related with an aversive learning process in the first session. Using different exposition times during the first session it was investigated the influence of the initial exposition time on appearance and possible removal of the OTT phenomenon.

The results suggest that the behavioural variables indicators of emotional memory and anxiolytic effect were associated to the exposition time of each animal into the first session. Evidence of this, is the absence of Diazepam anxiolytic effect on that animals exposed during 1 and 5 minutes during the first session, instead of that animals exposed during 10, that was possible to obtain evidence about the anxiolytic effect since 8 minutes of the second session or 18 accumulated minutes during both sessions.

Additionally, the accumulated time into the open arms during the second session (control rats) as function of the experimental time, show a good lineal fit that could be beginning since the first session into the EPM. Taking together, the results indicate the OTT phenomenon could be considered as learning interference time dependent.

* Degree Project

** Science Faculty. Biology Department. Advisors: Carlos Arturo Conde, Carolina Velásquez.

INTRODUCCION

El Laberinto en Cruz Elevado (LCE) es un modelo animal utilizado para evaluar trastornos relacionados con la ansiedad tales como: fobia (File et al., 1998) y ansiedad generalizada (Lamprea et al., 2000). Este modelo se fundamenta en la aversión natural de los roedores por la altura y los espacios abiertos, (Lister, 1987; Treit et al., 1993; Fernandes et al, 1996). Los trabajos realizados con el LCE reportan una preferencia de los roedores por los brazos cerrados, sin embargo la administración de fármacos ansiolíticos permiten un aumento en el número de entradas a brazo abierto y tiempo de permanencia en estos comparados con el grupo control sin el ansiolítico (Pellow et al, 1985).

Sin embargo, cuando el animal ha permanecido por 5 minutos en el LCE en la primera experiencia (sesión 1), se ha encontrado que el efecto ansiolítico de las benzodiazepinas es reducida o abolida en una segunda experiencia (sesión 2), a este fenómeno se le ha referido como "One-Trial Tolerance" (OTT) (File et al., 1990).

Las hipótesis sugeridas para explicar el fenómeno plantean un tipo de habituación locomotora (Dawson et al, 1995), sensibilización al miedo producido por los brazos abiertos (Rodgers et al., 1993), o un cambio cualitativo en el estado emocional producido por una re-exposición al LCE (Holmes et al., 1998). File et al (1993) plantea la adquisición de un tipo de fobia durante los primeros 5 minutos, frente a la cual las benzodiazepinas son inefectivas, pero con exposiciones de 20 minutos acumulados (sesión 1 + sesión 2) este tipo de manifestación desaparece. La disminución en el porcentaje de entradas a brazo abierto en la segunda sesión y bajo los efectos de las benzodiazepinas, ha sido relacionada con un tipo de aprendizaje aversivo, (File et al., 1990). En este aspecto se ha propuesto que aunque las benzodiazepinas pueden evitar la adquisición de información aversiva, estas no pueden evitar la expresión de la memoria emocional (González et al., 1997).

Situaciones en las cuales el proceso de aprendizaje podría ser interrumpido han sido empleadas para prevenir el fenómeno, por ejemplo la utilización de un conflicto motivacional (Pereira et al., 1999;), el uso de fármacos como la Escopolamina (Bertoglio et al., 2004), o la utilización de tiempos limitados en la sesión 1 (Dal-Cól et al., 2003; Calzavara et al., 2005). Este último aspecto ha sido investigado ampliamente (Holmes et al., 1999). De manera convencional el tiempo utilizado para evaluar el fenómeno ha sido establecido en 5 minutos en la sesión 1 (File et al., 1990), sin embargo utilizando tiempos inferiores (1 y 2 minutos), evidencian una pérdida de la acción ansiolítica de las benzodiazepinas en sesiones posteriores de 5 minutos (Rodgers et al., 1996; Calzavara et al., 2005). Por el contrario, Dal-Col y colaboradores (2003) observaron un efecto ansiolítico de midazolam en la segunda sesión en tratamientos que emplearon 1 minuto en la sesión 1.

También se ha incrementado la duración de la primera sesión a 10 minutos, evidenciando el fenómeno en una sesión posterior de 5 minutos (Holmes et al., 1999), En este aspecto se ha propuesto que tiempos acumulados de 15 minutos entre sesiones, permiten observar el fenómeno (File et al., 1993a ;Holmes et al., 1999) .El fenómeno OTT no es observado cuando se utilizan tiempos acumulados de 20 minutos entre sesiones (File et al., 1993a ;Holmes et al., 1999). Por otro lado, el intervalo entre sesiones parece no afectar la manifestación del fenómeno, dado que se ha reportado que el fenómeno OTT persiste con un intervalo de 48 horas a 15 días (File et al., 1990). La utilización de medidas convencionales al igual que, análisis detallados minuto a minuto permiten observar el comportamiento durante la sesión, (Rodgers et al., 1996)

El fenómeno OTT ha sido ampliamente estudiado, sin embargo existe controversia frente al factor tiempo acumulado y su relación con la presencia del fenómeno OTT. De esta manera la utilización de tiempos cortos de 1 minuto, así como la proporción de tiempos largos de 10 minutos, comparados con el tiempo utilizado convencionalmente para evaluar el fenómeno (5 minutos) ofrecerá resultados destinados a caracterizar el fenómeno OTT, y al

mismo tiempo describir cambios neurobiológicos, en los animales como resultado de la experiencia en el LCE. Se plantea entonces la siguiente hipótesis: Si el fenómeno de OTT está relacionado con el tiempo de exposición acumulado en dos sesiones experimentales en el LCE, diferentes tiempos de exposición al laberinto deberán permitir detectar la aparición y posible eliminación del OTT.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto comportamental de diferentes tiempos de exposición al laberinto en cruz elevado sobre el fenómeno de *One-trial Tolerance* (Wistar-UIS).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Material animal

Se utilizaron 60 ratas (Wistar-UIS) machos con peso promedio entre 190 y 230 g, con edades entre 12 y 14 semanas. Los animales fueron ubicados en grupos de 5 o 6 por caja de (50x30x15cm), y mantenidos bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h (7h-19h), a temperatura promedio de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, y humedad relativa de $66 \pm 5\%$, con acceso libre al alimento y agua. Los animales fueron transportados al laboratorio de experimentación 72h antes de su exposición al laberinto. El cuarto de experimentación presentaba las mismas condiciones ambientales del bioterio (T° ; humedad; ciclos luz/oscuridad). Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en seis grupos experimentales como se muestra en la tabla 1.

2.2 Fármaco

Diazepam (DZP, 2 mg/kg, Roche) y como solución control fue utilizada solución salina 0.9% p/v. Se administraron por vía intraperitoneal (IP) en un volumen de 1ml/kg, 30 minutos antes del test. (Tiempo en el cual el diazepam tiene su efecto ansiolítico). De igual forma para los grupos de solución salina, con el fin de mantener el control de dicha variable.

2.3 Laberinto en Cruz Elevado

El LCE es un dispositivo hecho en madera, con 4 brazos distribuidos en forma de cruz. Cada brazo mide 50x12 centímetros y están elevados 50 cm sobre el suelo. Los dos Brazos Cerrados (BC), colocados uno al frente del otro, tienen paredes laterales de 40 cm. de altura, permitiendo solamente como vía de acceso el centro del laberinto. Los otros dos brazos, Brazos Abiertos (BA), de iguales dimensiones y opuestas entre si, tienen como paredes laterales un

pequeño borde de acrílico transparente (plexiglas) de 2 cm. de altura (Pellow et al, 1985). El cuarto donde se encuentra el laberinto esta amortiguado acústicamente y la luminosidad en el centro del laberinto es de 296 lux.

2.4 Procedimiento

Las sesiones experimentales se llevaron a cabo entre las 13h y 18h (ciclo claro). Cada animal fue ubicado en el centro del laberinto con su cabeza orientada hacia uno de los BC permitiendo su exploración libre durante el tiempo determinado (ver tabla 1). El intervalo entre la sesión 1 y sesión 2 fue de 72h . La limpieza del laberinto se llevó a cabo antes de la exposición del primer animal y entre las exposiciones de cada uno, esta se realizó con algodón humedecido en solución de etanol (10% v/v) y posteriormente secado con papel absorbente. Las sesiones fueron monitoreadas y filmadas con la ayuda de una cámara de video ubicada a 1.5m arriba del laberinto y su señal fue enviada a un sistema TV-VHS ubicado en una sala adyacente para posterior registro y procesamiento de comportamientos utilizando un conjunto de programas computacionales, PROSTCOM (Conde et al., 2000).

Se realizaron dos sesiones; en la primera, las ratas fueron distribuidas en tres grupos experimentales con 20 animales cada uno (tabla 1). Todos los grupos recibieron inyección intraperitoneal 30 minutos antes del test (solución salina, SS al 0.9% p/v) y posteriormente se expusieron al laberinto el tiempo correspondiente al tratamiento. El intervalo entre sesiones fue de 72 horas. Antes de la segunda sesión, dentro de cada grupo experimental los animales fueron asignados aleatoriamente para formar dos subgrupos. Uno de ellos fue el control (SS) y el otro Diazepam (DZP). En la segunda sesión, todos los animales se expusieron al LCE durante 10 minutos (Tabla 1).

2.5 Análisis Comportamental

Los parámetros comportamentales analizados en el LCE fueron la frecuencia de entradas a brazo abierto (EBA) y el tiempo de permanencia en brazo abierto (TBA). Estos datos se utilizaron para calcular porcentaje de entradas a brazo abierto (%EBA), porcentaje de tiempo en brazo abierto (%TBA) y tiempo acumulado en los brazos abiertos. Los parámetros utilizados para medir actividad locomotora fue la suma del número de entradas a BC y número total de entradas a BA.

2.6 Análisis Estadístico

Sesión 1

Con el fin de analizar la evolución temporal de las permanencias en los brazos abiertos, en la sesión 1 durante los primeros 5 minutos, (datos tomados de los grupos de 5 y 10 minutos) se realizó un ANOVA de un factor para medidas repetidas. El factor fue cada minuto en que se realizó la evaluación de la variable de salida que fue el TBA.

Sesión 2

Para la sesión 2, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tratamiento farmacológico y tiempos de exposición en la primera sesión), sobre cada medida comportamental (EBA, %EBA, TBA, %TBA, Actividad locomotora), seguidas de comparaciones múltiples utilizando el test de Bonferroni cuando el ANOVA mostró diferencias significativas. Los datos que no presentaron una distribución normal fueron transformados utilizando la raíz cuadrada, para cumplir con este criterio. El nivel de significancia fue fijado en el 5%.

Adicionalmente, se realizaron las medidas comportamentales en forma detallada utilizando un tipo de registro minuto a minuto para los diferentes tratamientos. El análisis estadístico se realizó para la sesión 2, utilizando un análisis de *t*-test para muestras pareadas utilizando la variable comportamental (TBA)

Sesión 1 - sesión 2

Mediante un ANOVA de un factor para medidas repetidas, Se evaluó el efecto de diferentes tiempos de exposición en la sesión 1 utilizando la variable comportamental (TBA) sobre las manifestaciones comportamentales 72 h después, en la sesión 2, en animales que recibieron solución salina en las dos sesiones.

2.7 Consideraciones Éticas

El presente proyecto fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander (Código: DIEF 1007048). Todos los procedimientos que fueron realizados a los animales dentro de este proyecto se acogen a la resolución 8430 de 1993 (Título V) y a la ley 84 de 1989.

3. RESULTADOS

Sesión 1

En la figura 1 se muestra el análisis realizado con ANOVA de un factor para medidas repetidas, reportando una diferencia entre el minuto 1 y el minuto 3 ($F_{(1,58)} = 23,973$ $p < 0,001$) y entre el minuto 1 y el minuto 5 ($F_{(1,58)} = 10,505$ $p < 0,05$).

Sesión 2

Las figuras (2 a 5) ilustran las diferentes variables registradas en los brazos abiertos del LCE, para cada grupo experimental T1, T5 y T10 los cuales recibieron diazepam (DZP) o solución salina (SS), 30 minutos antes de la sesión 2. Los análisis reportan el efecto del diazepam y la experiencia previa en la primera sesión sobre el variables dependientes en la sesión 2.

3.1 Entradas relativas a brazos abiertos (%EBA) (sesión 2)

Mediante el análisis de ANOVA de dos factores, se revelan diferencias significativas en el %EBA atribuibles al factor (tiempo) ($F_{(2,54)} 3.869$ $P < 0.05$) pero no para el factor (fármaco) ($F_{(2,54)} 3.666$ $p = 0.061$) y sin interacciones significativas fármaco x tiempo ($F_{(2,54)} 0.729$ $p = 0.489$). El test de Bonferroni, mostró que el grupo T1 presentó un mayor porcentaje de entradas a BA que el grupo T10 ($t = 2.880$, $p < 0.05$)

3.2 Tiempo absoluto en brazo abierto (TBA) (sesión 2)

En la variable comportamental TBA no se revelan diferencias significativas entre los TBA de los grupos experimentales atribuibles a los factores (fármaco) ($F_{(2,54)}=0.862$ $p=0.357$), y tiempo ($F_{(2,54)}=1.238$ $p=0.298$) y sin interacción fármaco x tiempo ($F_{(2,54)}=0.858$ $p=0.43$)

3.3 Tiempo relativo de permanencia en brazo abierto (%TBA) (sesión 2)

El análisis de ANOVA de dos factores no revelan diferencias significativas para el factor (fármaco) ($F_{(2,54)}=1.521$ $p=0.223$), pero si para el factor (tiempo) ($F_{(2,54)}=3.615$ $p<0.05$) sin interacción fármaco x minuto ($F_{(2,54)}=0.983$ $p=0.381$) el test de bonferroni, el cual mostró que el grupo T1 presentó un mayor % de tiempo en BA que el grupo T10 ($t=2.481$, $p<0.05$)

3.4 Actividad locomotora en general (sesión 2)

No se detecta diferencias significativas entre los grupos experimentales (T1, T5 y T10), en la variable comportamental cruzamientos. Factor F1 (fármaco) ($F_{(2,54)}=0.246$ $p=0.622$), Factor F2 (tiempo) ($F_{(2,54)}=2.755$ $p=0.07$) sin interacción fármaco x minuto ($F_{(2,54)}=1.670$ $p=0.198$).

3.5 Tiempo en brazo abierto sesión 1 - sesión 2

Las comparaciones realizadas mediante el análisis de ANOVA de un factor para medidas repetidas mostró diferencias significativas entre la primera y segunda sesión de cada grupo que le fue administrado solución salina en las dos sesiones T1, T5 y T10 ($p<0.05$) al comparar la variable comportamental (TBA) (Tabla 2). En todos los casos en que se encontró diferencias significativas, el TBA en la sesión 2 fue menor que el TBA en la sesión 1, aunque la duración global de la sesión 1 hubiera sido menor que de la sesión 2.

3.6 Análisis minuto a minuto

La figura 6 representa el análisis realizado para los tiempos acumulados de animales expuestos por 10 minutos. Mediante el *t*-test para muestras pareadas se reportan diferencias significativas entre los TBA acumulados en los animales con diazepam y el grupo control a partir del minuto 18 del tiempo acumulado ($t = 1.77$ $p < 0.05$). Los tiempos de permanencia acumulados en los brazos abiertos a lo largo de las dos sesiones experimentales, muestran una tendencia lineal significativa ($R^2: 0.9725$ y una pendiente de 1.4577) para el grupo de ratas control (SS). En la segunda sesión, las ratas tratadas con diazepam también mostraron una tendencia lineal significativa de los tiempos de permanencia acumulados en los brazos abiertos en función del tiempo experimental acumulado en las dos sesiones ($R^2: 0.9721$ y una pendiente de 7.8156); sin embargo, para este grupo, la pendiente es claramente mayor que para el grupo control (Figura 6). En los grupos de 1 minuto ($t = 0.0594$ $p = 0.953$) y 5 minutos ($t = 1,775$ $P = 0,079$) no se encontraron diferencias significativas entre los TBA acumulados en los animales con diazepam y el grupo control.

4. DISCUSION

Se ha intentado validar al LCE como un posible modelo animal para comprender los mecanismos neurobiológicos del trastorno de estrés postraumático TEPT (Adamec et al., 1998; Botelho et al., 2003), en este sentido el fenómeno OTT ha sido relacionado con un TEPT, teniendo en cuenta algunos criterios. Por ejemplo, situaciones en las cuales estresores breves son capaces de provocar secuelas comportamentales, que persisten con el tiempo, al igual que la variabilidad individual en respuesta a un estresor deberá presentarse como una función de su experiencia o genética o una interacción entre las dos (Yehuda et al., 1993). Además del hecho que pacientes diagnosticados con el TEPT, no responden a los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas (Nestler et a 2001).

A la luz de los resultados cabe notar que el tiempo de exposición en la sesión 1 provoca respuestas comportamentales en la sesión 2 que pueden considerarse como TEPT, para los animales expuestos por 1 y 5 minutos, sin embargo los animales con 20 minutos acumulados en las dos sesiones muestran un efecto de tipo ansiolítico, en aquellos que recibieron diazepam mostrando que la re-exposición por largos periodos de tiempo, pueden abolir el fenómeno OTT.

La experiencia en el laberinto no parece ser tan simple de entender, en parte por su alta sensibilidad a factores exógenos previos, en este caso, la magnitud del tiempo utilizado en una experiencia previa logró modificar la respuesta comportamental en una segunda exposición. El análisis comparativo entre los diferentes tiempos de exposición mostró que los animales disminuyeron el porcentaje de entradas a los BA en la sesión 2, en especial los grupos que fueron expuestos por 10 minutos en la sesión 1 T1>T10 (Figura 2).

En este sentido la comparación entre las variables comportamentales (EBA, %EBA, TBA, %TBA) mediante el análisis de ANOVA de dos vías no revela diferencias significativas entre el grupo expuesto por 1 minuto y el grupo expuesto por 5 minutos, sugiriendo que los cuatro minutos restantes no cambian substancialmente el comportamiento en el LCE 72 horas después.

El enfoque del estudio pretendió evaluar las posibles variaciones en el comportamiento, dependiente de los tiempos de exposición iniciales, entonces no se puede dejar de lado el análisis de los 5 minutos iniciales y su posterior efecto en la segunda sesión. Desde la caracterización del fenómeno se ha utilizado este tiempo como referente cuando se evalúa el fenómeno OTT (File, 1993). Los resultados registran la pérdida de la acción ansiolítica del diazepam en el grupo que recibió 5 minutos. Estos primeros 5 minutos parecen representar para el animal un tiempo utilizado en la adquisición de información aversiva, mostrando una alta preferencia por los brazos cerrados, en particular durante el minuto 3 (Figura 1)

La transferencia de información desde la sesión 1, es evidenciada por la disminución en el porcentaje de entradas a brazo abierto en la segunda sesión para los grupos de solución salina (Tabla 2) sin embargo el fenómeno OTT solo es observado en los dos grupos 1 y 5 minutos pero no en el grupo de 10 minutos.

Sin embargo Dal-col et al (2003), quien utilizó 1 minuto en la primera sesión, no visualizó el fenómeno OTT en una sesión posterior de 5 minutos. En el presente trabajo se observó el fenómeno OTT, en grupos que utilizaron 1 minuto en la sesión 1, con una sesión posterior de 10 minutos. Similar a lo reportado por Calzavara et al (2005), quien utilizó 5 minutos en la sesión 2.

Estos resultados han sido reportados anteriormente por Rodgers et al (1996), Rosa et al (2000), Calzavara et al (2005), los cuales resaltan la importancia de los primeros minutos en el aprendizaje aversivo, como parte del reconocimiento

y adquisición de la información aversiva que se encuentra en las diferentes áreas del LCE.

Por otro lado, la utilización de 10 minutos en la sesión 1 muestran cambios comportamentales importantes en la sesión 2, los cuales, por ejemplo, evidencian la desaparición del fenómeno OTT, en la variable comportamental porcentaje de EBA para el factor fármaco (Figura 2), siendo notorio un comportamiento ansiolítico durante los minutos 18,19 y 20, tiempo en el cual los animales que recibieron DZP permanecieron mayor tiempo en brazo abierto comparado con los animales que recibieron SS. (Figura 6).

File et al (1993) plantea la adquisición de un tipo de fobia durante los primeros 5 minutos, frente a la cual las benzodiazepinas son inefectivas, pero con exposiciones de 20 minutos acumulados (sesión 1 + sesión 2) este tipo de manifestación desaparece. En contraste, se ha sugerido que el factor crucial en la presencia del fenómeno es el reconocimiento de áreas seguras en el laberinto o la experiencia en todo el dispositivo (Frussa-Filho., 2002; Bertoglio et al.,2002).

CONCLUSIONES

La utilización de tiempos de exposición de 1 minuto parecen ser suficientes para adquirir información de tipo aversiva del LCE, y tiempos de 5 minutos confirman las etapas críticas en el proceso de memoria, es decir la experiencia en el laberinto, provoca en el animal respuestas motivadas por un aprendizaje aversivo frente a los brazos abiertos, mostrando una alta preferencia por los brazos cerrados.

En conclusión los resultados muestran un cambio comportamental en la sesión 2; evidenciado por la presencia y desaparición del fenómeno OTT dependiente de tiempos de exposición diferenciales.

La disminución en el porcentaje de entradas a brazo abierto en la segunda sesión 72 horas después, sugiere la transferencia de información entre sesiones, situando a la magnitud de tiempo experimental como una variable que puede llegar a modificar el aprendizaje, llevado a cabo en la primera sesión. Tanto la interrupción en el proceso como la proporción de tiempo suficiente de exploración del laberinto, permiten observar el fenómeno OTT en los dos grupos (1 y 5 minutos) y comportamientos ansiolíticos en animales que recibieron diazepam en el grupo experimental de 10 minutos.

REFERENCIAS

- ADAMEC R., KENT P., ANISMAN H., SHALLOW T., MERALI Z., 1998. Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals-implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 23, 301-318.
- BERTOGLIO L., CAROBREZ, 2002. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze 91. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 72, 449-455.
- BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P., 2004. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. *Behav. Pharmacol.* 15, 45–54.
- BOTELHO S., CONDE CA., 2003. Modelos animales de estrés post traumático. *Salud UIS.* 35 97-107
- CALZAVARA M., PATTI C., LOPEZ G., ABÝ'LIO V., SILVA R., FRUSSA-FILHO R., 2005. Role of learning of open arm avoidance in the phenomenon of one trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in mice. *Life Sciences* 76, 2235-2246.
- CONDE C., COSTA V., TOMAZ C., 2000. Un conjunto de programas para el registro y procesamiento de datos comportamentales en investigación de fisiología y farmacología. *Biotemas* 13, 145-159.
- DAL-CÓL M., PEREIRA L., ROSA V., CALIXTO A., CAROBREZ, FARIA M., 2003. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the elevated plus maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 74, 395-400.
- DAWSON G., TRICKLEBANK M., 1995. Use de elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacology Sci.* 16, 33-36.
- ESPEJO EF. 1997. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behav Brain Res*;87:233– 8

- FERNANDES C., FILE SE, 1996. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 54, 31-40.
- FILE SE, 1990. One trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the plus maze. *Psychopharmacology* 100, 281-282.
- FILE S., 1993. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research* 58, 199-202.
- FILE S., GONZALES L., GALLANT R., 1998. Role of the Basolateral Nucleus of the Amygdala in the Formation of a Phobia *Neuropsychopharmacology* 19, 397-405.
- FILE S., MABBUT P., HITCHCOTT P., 1990. Characterization of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus maze. *Psychopharmacology* 102, 98-101.
- FILE S., ZANGROSSI H., 1993. "one trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology* 110, 240-244.
- FILE S., ZANGROSSI H., VIANA M., GRAEFF F., 1993a. Trial 2 in the elevated plus maze: a different form of fear? *Psychopharmacology* 111, 491-494.
- FRUSSA-FILHO R.R.R.DE.A., 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, 519-525.
- GONZALES LE, FILE SE.1997. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci*;17:1505– 11.
- HOLMES A., RODGERS RJ., 1998. Responses of Swiss -Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state?. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 60, 473-488.

- HOLMES A., RODGERS R., 1999. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 23, 971-980.
- LAMPREA M., CARDENAS F.P., SILVEIRA R., MORATO S., WALSH T.J., 2000. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behavioural Brain Research* 117., 97-105.
- LISTER R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92, 180-185.
- NESTLER EJ, HYMAN SE AND MALENKA RC. 2001. Mood and emotional. In: *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*. United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc.:327-354
- PELLOW S., CHOPIN P., FILE S., BRILEY M. 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14, 149-167.
- PEREIRA, J.K., VIEIRA, R.J., KONISHI, C.T., RIBEIRO, R.A., FRUSSA-FILHO, R.,1999. The phenomenon of 'one trial tolerance' to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sci.* 65, 101–107.
- RODGERS R., JOHNSON N., COLE J., DEWAR C., KIDD G., KIMPSON P., 1996. Plus-Maze Retest Profile in Mice: Importance of Initial Stages of Trial 1 and Response to Post-Trial Cholinergic Receptor Blockade. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1), 41-50.
- RODGERS R., SHEPHERD JK., 1993. Influence of prior maze experience on behavior and response to diazepam in the elevated plus maze and light/dark test of anxiety in mice.. *Psychopharmacology* 113, 237-242.
- ROSA V., VANDRESEN N., CALIXTO A., KOVALESKI D., FARIA M., 2000. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze:effect of midazolam. *Pharmacology,Biochemistry and Behavior* 67, 177-182.

TREIT D., MENARD J., ROYAN C., 1993. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. Pharmacology Biochemistry and Behavior 44, 463-469.

YEHUDA R AND ANTELMAN SM.1993. Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. Biological Psychiatry.;1;33(7):479-86

Tabla 1. Grupos experimentales. T1 (1 min), T5 (5 min), T10 (10 min). Solución Salina (SS al 0.9% p/v), Diazepam (DZP, 2 mg/kg).

Grupos Experimentales	Número de animales	Sesión 1		Sesión 2	
T1	n=20	SS	1min	SS n=10	10min
				DZP n=10	10min
T5	n =20	SS	5min	SS n=10	10min
				DZP n=10	10min
T10	n =20	SS	10min	SS n=10	10min
				DZP n=10	10min

Tabla 2. Comparación sesión 1 y sesión 2, tiempo en brazo abierto (TBA), T1, T5, T10 y solución salina (SS), utilizando ANOVA de un factor para medidas repetidas desviación estándar (DS), Error Estándar de la Media (SEM).

TBA		SESION 1			SESION 2				
		Media	DS	SEM	Media	DS	SEM	F	P
T1	SS – SS	8	8,273	2,61	4,45	7,805	0,781	7,214	0,025
T5	SS – SS	5,484	10,015	1,41	1,92	4,816	0,482	7,833	0,007
T10	SS – SS	3,552	6,801	0,68	1,84	4,916	0,492	4,496	0,036

Figura 1. Porcentaje del tiempo de permanencia en BA durante los primeros 5 minutos en la primera sesión. * Diferencias significativas con respecto al primer minuto. Media \pm SEM. * p <0.05 y ** p <0.01. ANOVA de un factor para medidas repetidas.

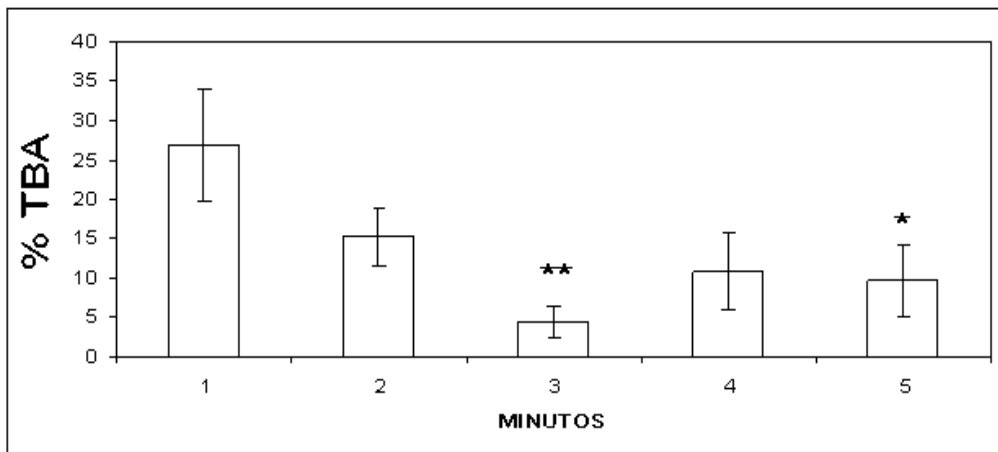


Figura 2. Tiempo relativo de entradas a brazo abierto entre tratamientos. (% EBA) en la sesión 2. Las medidas son representadas como Media \pm SEM. * $p < 0.05$ diferencias significativas, entre los tratamientos (T1, T5 y T10) y # $p < 0.05$ diferencias significativas entre grupos (DZP y SS).

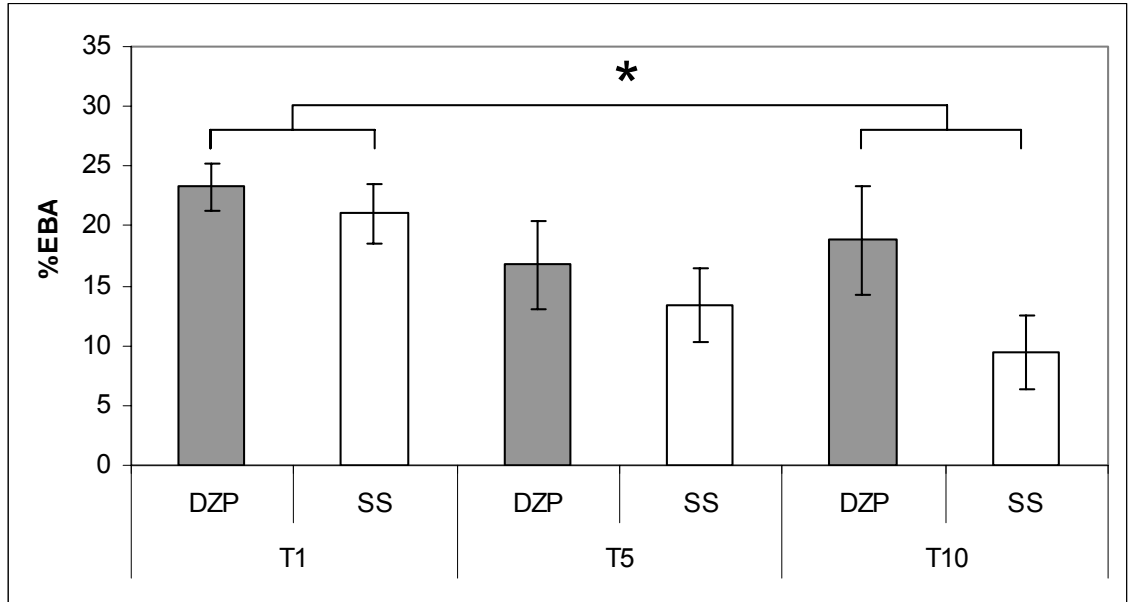


Figura 3. Tiempo absoluto en brazo abierto (tiempo en BA) en la sesión 2. Las medidas son representadas como Media \pm SEM.

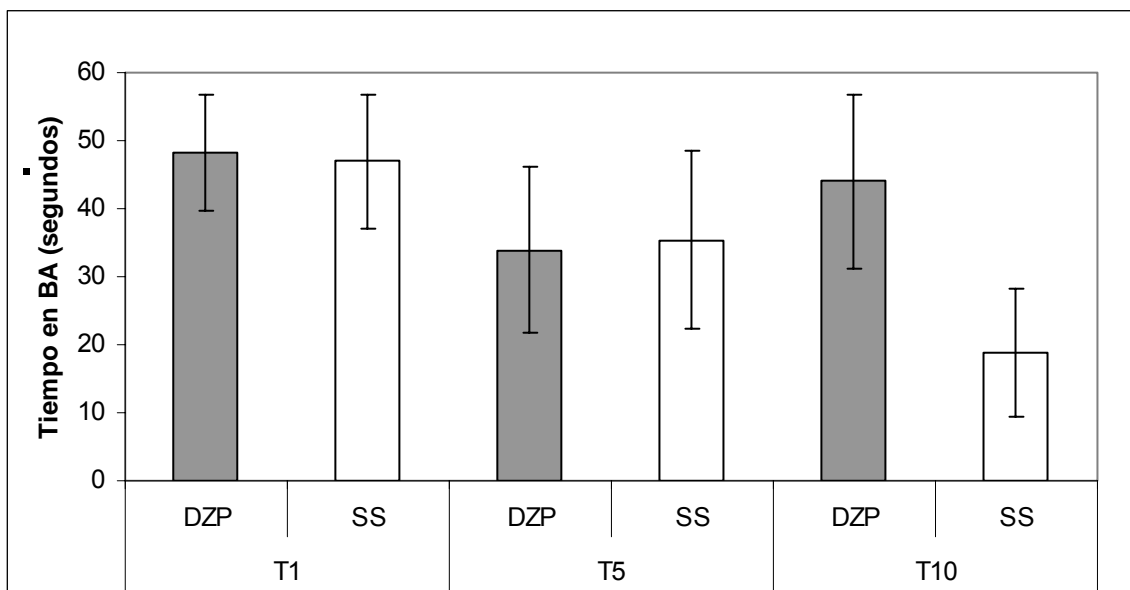


Figura 4. Porcentaje de tiempo en BA (% de tiempo en BA) en la sesión 2. Las medidas son representadas como Media \pm SEM. * $p < 0.05$ diferencias significativas, con respecto a los tratamientos (T1, T5 y T10).

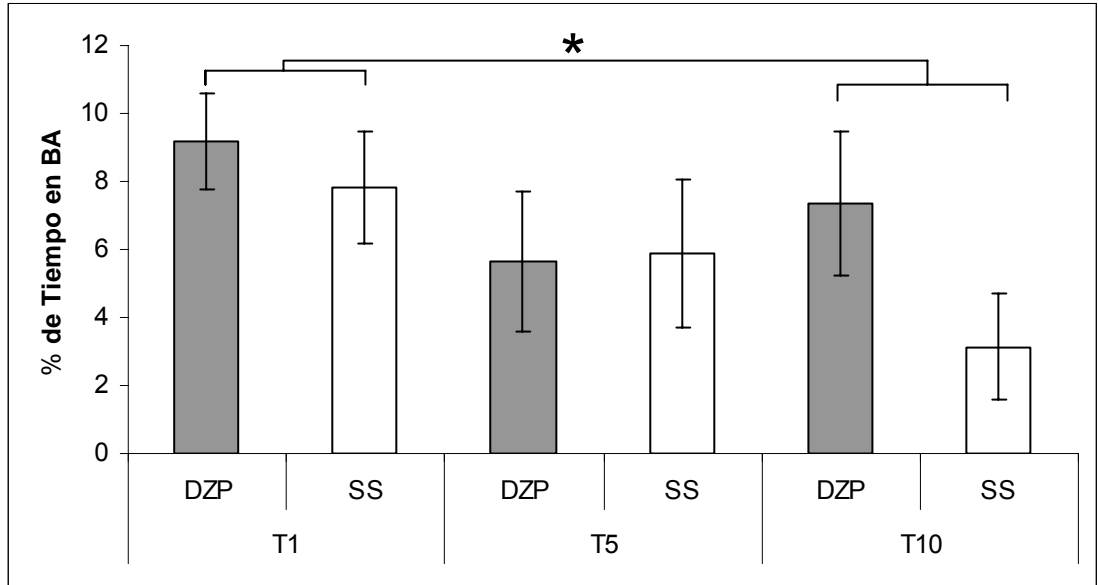


Figura 5. Numero de cruzamientos en la sesión 2. Las medidas son representadas como Media \pm SEM.

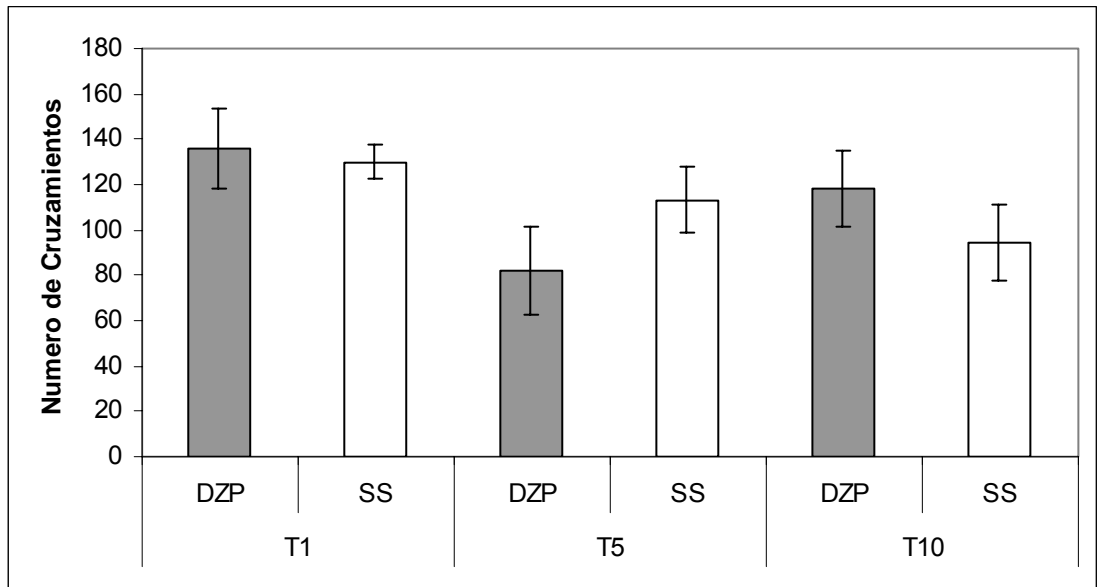


Figura 6. Evolución temporal de los tiempos acumulados en brazos del tratamiento de 10 minutos en la sesión 1 (T10), en ratas que recibieron solución salina (SS) - rombo negro -, o diazepam (DZP) - cuadrado vacío -.

