

**IMPACTO DEL CONFINAMIENTO SOBRE CRISIS CONVULSIVAS Y MEMORIA
EMOCIONAL EN RATAS WISTAR.**

ALBERTH JONNATHAN CARREÑO GONZÁLEZ



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2008**

**IMPACTO DEL CONFINAMIENTO SOBRE CRISIS CONVULSIVAS Y MEMORIA
EMOCIONAL EN RATAS WISTAR.**

ALBERTH JONNATHAN CARREÑO GONZÁLEZ

Trabajo de Investigación presentado como requisito parcial para optar al título de
Biólogo

Director:

Carlos Arturo Conde Cotes

Medico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2008

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Diana Pilar Martínez por su colaboración en la ejecución de la investigación y aportes en el escrito; así como a María Carolina Velásquez por sus correcciones en el lenguaje estadístico y en el escrito en general.

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	3
1.1 OBJETIVO 1	3
1.2 OBJETIVO 2	3
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. METODOLOGÍA	5
3.1 Animales	5
3.2 Aparatos	5
3.2.1 Laberinto en cruz elevado	5
3.2.2 Fármacos	6
3.2.3 Caja de acrílico	6
3.3 Diseño experimental	6
3.4 Procedimiento	6
3.4.1 Primera sesión	6
3.4.2 Segunda sesión	7
3.5 Procesamiento de datos	7
3.5.1. Suma de tiempos (ST): $\sum Tc$	7
3.5.2. Suma de Frecuencias (SF): $\sum Fc$.	7
3.5.3. Índice suma (IS) = $\sum (IR * Fc * Tc)$	7

4.	RESULTADOS	8
4.1	Manifestaciones comportamentales durante el confinamiento	8
4.2.	Efecto del confinamiento en el brazo abierto del LCE sobre la severidad de las crisis convulsivas	9
4.3.	Efectos del confinamiento sobre la memoria	10
5.	DISCUSIÓN	10
5.1	Manifestaciones comportamentales durante el confinamiento	10
5.2	Efectos del confinamiento sobre la memoria	11
5.3	Efecto del confinamiento en el brazo abierto del LCE sobre la severidad de las crisis convulsivas.	12
6.	CONCLUSIONES	13
7.	RECOMENDACIONES	13
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

LEYENDAS DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. A. Representa los promedios \pm error estándar de las entradas a los diferentes lugares del brazo abierto durante el confinamiento de los animales. B. Promedios \pm error estándar del tiempo relativo (%TBA) de permanencia en los lugares del brazo abierto durante el confinamiento. L1: Lugar 1 confinamiento n minutos. L2: Lugar 2 confinamiento n minutos y L3, lugar 3, confinamiento n minutos. * Diferencias significativas entre el grupo confinado por 5 minutos y el confinado por 10 minutos ($p < 0.05$).	18
Figura 2. Representa el promedio \pm error estándar de los tiempos acumulados en comportamientos convulsivos (según Racine). * Diferencia con respecto al grupo cero ($p < 0.05$).	19

LEYENDAS DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Escala con los comportamientos asociados a la severidad de las crisis epilépticas descritas por Racine 1.972	20
Tabla 2.	Descripción la distribución del número de animales por cada subgrupo. G0: en este grupo las ratas no fueron confinadas al brazo abierto del laberinto en cruz elevado. G5 y G10: corresponden al grupo de ratas confinadas por 5 o 10 minutos respectivamente. PTZ: animales que recibieron pentilentetrazol. (40 mg/kg en volumen de 1 ml/kg), (n=22) SS: animales que recibieron solución salina al 0.9% (p/v) (n=25)	20
Tabla 3.	Representa las diferencias entre los subgrupos al aplicar una prueba de Kruskal-Wallis. Las iniciales corresponden a los nombres de los comportamientos, acompañados del índice Racine para cada comportamiento entre los paréntesis, además de los nuevos índices convulsivos.	21
Tabla 4.	Representa los valores de prueba para cada variable analizada con Mann-Whitney. * Representa los valores con diferencias significativas ($p < 0.05$). La última columna representa los grupos que fueron diferentes entre si.	21

RESUMEN

Titulo:

IMPACTO DEL CONFINAMIENTO SOBRE CRISIS CONVULSIVAS Y MEMORIA EMOCIONAL EN RATAS WISTAR.

Autor:

Alberth Jonnathan Carreño González

Palabras claves:

Ansiedad, epilepsia, confinamiento, laberinto en cruz elevado, pentilentetrazol, estrés.

Descripción:

Introducción: Hallazgos de diferentes laboratorios y casos clínicos muestran una notable sobreposición comportamental, fisiológica, farmacológica y neuroanatomica entre la ansiedad y epilepsia. Por esta razón, el presente trabajo evaluó los efectos de diferentes tiempos de confinamiento en uno de los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado, como una estrategia para inducir estado de ansiedad, sobre la severidad de las crisis convulsivas inducidas por pTZ y la memoria emocional.

Metodología: Fueron evaluadas 47 ratas divididas en tres grupos por tiempo de confinamiento en el brazo abierto del EPM (0, 5 o 10 min). Inmediatamente después del confinamiento, la mitad del grupo fue inyectado (i.p.) con SS y otra con PTZ, seguidos por 30 minutos de evaluación comportamental de las convulsiones. Tres días después, fueron evaluadas en el LCE.

Resultados: No se observaron diferencias significativas de comportamientos exploratorios entre grupos en la segunda sesión en el LCE, pero se encontró que los animales confinados presentaron menor intensidad de manifestaciones convulsivas que los otros animales.

Conclusiones: En este experimento, no se puede concluir que diferentes tiempos de confinamiento mas el tratamiento farmacológico usado, inflencie significativamente la memoria emocional. Un nivel moderado de estrés / ansiedad, podría inducir resistencia a las crisis convulsivas inducidas por PTZ.

ABSTRACT

Title:

CONFINEMENT IMPACT ON SEIZURES CRISIS AND EMOTIONAL MEMORY IN WISTAR RATS

Author:

Alberth Jonnathan Carreño González

Key words:

Anxiety, epilepsy, confinement, elevated plus maze, pentilenetetrazole, stress.

Description:

Introduction: Findings from different laboratories and clinical cases show a noticeable behavioral, physiological, pharmacological and neuro-anatomical overlapping between anxiety and epilepsy. For that question, the current work aimed to evaluate the effects of different confinement time into one open arm of the elevated plus maze, as one strategy to induce an anxiety state, on the severity of seizures crisis induced by PTZ and the emotional memory.

Methodology: It was evaluated 47 male Wistar rats divided in three groups by confinement time into one open arm of the EPM (0, 5, or 10 min). Immediately after confinement, one half of each group was injected (i.p.) with SS and another with PTZ, followed by 30 minutes of seizure behavioral evaluation. Three days later, were evaluated in the EPM.

Results: It was not observed significant differences of explorations behaviors between groups in the second session into the EPM, but it was founded that confined animals presented lower convulsive manifestations that another animals.

Conclusions: Into this experiment, it can not conclude that different confinement time plus the pharmacological treatment used, influence significantly on the emotional memory, a moderated level of stress / anxiety, could induce resistances to seizures crises induced by PTZ.

INTRODUCCIÓN

Resultados en diferentes laboratorios muestran un marcado solapamiento comportamental, fisiológico y neuroanatómico de la ansiedad y la epilepsia, siendo especialmente grande la superposición existente a nivel anatómico, encontrando que las dos patologías reclutan substratos como el complejo amigdalino (AC), sustancia gris periacueductal (PAG) y el colículo inferior (Blanchard et al. 1981; Garcia-Cairasco et al.1989; Tomaz et al.1992). De igual forma, se sabe que tanto la epilepsia como la ansiedad responden en muchos casos a los mismos fármacos (Chapoutier y Venault, 2001), de manera que ambas presentan una disminución de sus manifestaciones cuando se administran benzodiacepinas tales como el diazepam, siendo requeridas dosis mas bajas para atenuar las manifestaciones de ansiedad que para las de la epilepsia (File 1996).

Por otro lado en humanos, se sabe que pacientes con crisis epilépticas presentan una prevalencia en trastornos de ansiedad significativamente mas alta que los individuos de la población en general (Mensah et al 2007), en este sentido Jacoby y colaboradores (1.996) demostraron que la ansiedad en pacientes con epilepsia esta asociada con un incremento en la actividad convulsiva.

En la búsqueda de un mejor entendimiento de la neurobiología de la ansiedad, se han desarrollado diversas aproximaciones experimentales tales como el laberinto en cruz y T elevados, de transición claro y oscuro e interacción social, con el fin de reproducir algunas características comportamentales, fisiológicas y neurobiológicas observadas en humanos (Conde et al. 1999; Crawley 1981; File y Hyde 1978; Pellow 1985).

El laberinto en cruz elevado (LCE) es uno de los modelos animales de ansiedad generalizada más ampliamente utilizado, principalmente en el estudio de la memoria emocional y “screening” de nuevos psicofármacos (Carobrez y Bertoglio 2005; File 1993).

El comportamiento en el LCE puede verse influenciado por diversos factores inherentes al individuo, como la edad o género, así como el ambiente específico en donde se encuentra el laberinto, como lo es el nivel de iluminación (Imhof et al.

1993; García et al. 2005) entre otros. De igual manera, el comportamiento en el LCE también puede ser alterado por variaciones en el procedimiento, como una reexposición al laberinto, el momento en el día en el que se realizan las sesiones experimentales y el confinamiento, bien sea al brazo abierto o al cerrado (File et al 1.990; Griebel et al. 1993).

Considerando la sobre-posición de sustratos anatómicos y demás elementos comunes en los mecanismos neurobiológicos relacionados con la ansiedad y epilepsia, se esperaría que los animales expuestos a estímulos ansiogénicos por mayor tiempo, tengan una mayor severidad de crisis convulsivas inducidas por el PTZ que aquellos que expuestos por un menor tiempo. El presente estudio sometió a consideración esta hipótesis, al tiempo que evaluó el impacto mnemónico a largo plazo producto de diferentes tiempos de confinamiento al BA.

1. OBJETIVOS

1.1. Evaluar el efecto de diferentes tiempos de confinamiento de la rata a un BA del LCE sobre la severidad de las crisis convulsivas inducidas por Pentilentetrazol.

1.2. Evaluar el efecto de diferentes tiempos de confinamiento de la rata a un BA del LCE sobre la memoria emocional

2. JUSTIFICACIÓN

Considerando la sobre-posición de sustratos anatómicos y demás elementos comunes en los mecanismos neurobiológicos relacionados con la ansiedad y epilepsia, se esperaría que los animales expuestos a estímulos ansiogénicos por mayor tiempo, tengan una mayor severidad de crisis convulsivas inducidas por el pentilentetrazol (PTZ) que aquellos que expuestos por un menor tiempo. El presente estudio sometió a consideración esta hipótesis, al tiempo que evaluó el impacto mnemónico a largo plazo producto de diferentes tiempos de confinamiento al BA.

3. METODOLOGIA

3.1. Animales

Fueron utilizadas Ratas Wistar macho provenientes del bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, con peso promedio de 250 ± 40 gramos y 4 meses de edad, alojadas en jaulas de metal (seis animales en cada una) durante los cinco días previos al comienzo del experimento. Un día antes de la primera sesión se les marcó con un código de colores (en la base de la cola) y posteriormente fueron pesadas.

Los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*, mantenidos bajo temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad de $65\% \pm 5$, ciclos de luz / oscuridad de 12 horas siendo encendida la luz a las 7 horas.

Los experimentos fueron ejecutados entre las 13 y las 18 horas. El tratamiento de los animales contó con la aprobación del comité de ética de la Universidad Industrial de Santander (Facultad de salud) acogiéndose a la resolución 8430 de 1993 (Título V) y a la ley 84 de 1989.

3.2. Aparatos

3.2.1. Laberinto en cruz elevado (LCE)

Es un dispositivo construido en madera, con cuatro brazos dispuestos en cruz, cada uno de ellos mide 50 centímetros de longitud y 12 centímetros de ancho, elevados 50 centímetros del suelo. Dos de sus brazos poseen paredes laterales de 40 centímetros de altura, brazos cerrados (BC), mientras que los restantes dos brazos poseen pestañas laterales de acrílico de 2 centímetros de altura, brazos abiertos (Griebel y colaboradores 1993). Esta localizado en un cuarto con condiciones ambientales similares a las del bioterio, con un nivel de iluminación de 276 lux en el centro del laberinto; este cuarto está dotado de un sistema de circuito cerrado de televisión, permitiendo registrar y grabar los compartimientos de cada animal desde un cuarto contiguo, del cual esta separado por una pared que proporciona una amortiguación acústica al mismo.

En la primera sesión, para efectos del confinamiento, la salida del BA fue clausurada por una cartulina negra, el brazo confinado fue dividido en 3 regiones

virtuales sobre la proyección del laberinto que se obtuvo en la pantalla del televisor. Estas regiones se denominaron lugar 1, 2 y 3, en donde el lugar 1 corresponde al tercio proximal a la pared que obstruyó la salida del brazo, el lugar 2 corresponde al tercio medio y el lugar 3 al tercio distal.

3.2.2. Fármacos

El pentilentetrazol (PTZ) fue descrito inicialmente como un fármaco convulsivante en humanos (Rodin 1958), sin embargo hoy en día es reconocido también como un fármaco ansiogénico en dosis subconvulsivas (Venault y colaboradores 1992). Fue administrado por vía intraperitoneal en dosis de 40 mg/kg en volumen de 1 ml/kg. A manera de control se utilizaron inyecciones intraperitoneales de solución salina al 0.9% (p/v).

3.2.3. Caja de acrílico

Para observar los comportamientos convulsivos, las ratas fueron colocadas en una caja transparente de acrílico (30x30x40cm) en donde se filmaron sus comportamientos después de la inyección de PTZ o vehículo (solución salina), para la posterior determinación de los comportamientos convulsivos según la escala de Racine 1.972. (Tabla 1)

3.3. Diseño experimental:

Fueron evaluadas cuarenta y siete (47) ratas machos, distribuidas en tres grupos experimentales (Tabla 2)

3.4. Procedimiento:

3.4.1. Primera sesión:

El primer día los animales fueron confinados a un BA del LCE o no (ver diseño experimental), inmediatamente después, cada uno recibió una inyección con el fármaco correspondiente (PTZ o SS), para ser observadas durante 30 minutos en la caja de acrílico y así establecer la severidad de las convulsiones.

3.4.2. Segunda sesión:

Pasados ocho días, la totalidad de las ratas fueron expuestas al laberinto completo (sin obstrucción de ninguno de los brazos) durante 5 minutos.

3.5. Procesamiento de datos

Los registros de todos los comportamientos (en confinamiento, LCE completo y los convulsivos) fueron procesados con el programa semi-automatizado Prostcom (Conde y colaboradores 2000).

Para el análisis comportamental en el LCE, se tuvieron en cuenta el número de entradas a los diferentes lugares del laberinto (en valores absolutos y relativos) así como el tiempo de permanencia acumulado en cada lugar, obteniendo los porcentajes de entradas al BA (%EBA) y tiempo de permanencia en el BA (%TBA), los cuales constituyeron los indicadores de ansiedad.

Tomando el número de veces y la duración de cada uno de los comportamientos convulsivos, se calcularon las frecuencias acumuladas y los tiempos de permanencia en los comportamientos de tipo convulsivo según Racine, para así construir los siguientes índices:

3.5.1. Suma de tiempos (ST): $\sum Tc$

Donde: Tc es el tiempo acumulado de un determinado comportamiento convulsivo. Representa el tiempo total acumulado en 30 minutos de observación post-inyección, que cada animal permaneció emitiendo comportamientos convulsivos.

3.5.2. Suma de Frecuencias (SF): $\sum Fc$.

Donde Fc es la frecuencia acumulada de un comportamiento convulsivo. Este índice representa la frecuencia acumulada de todos los comportamientos de tipo convulsivo.

3.5.3. Índice suma (IS) = $\sum (IR * Fc * Tc)$

Donde: IR es el valor del índice de Racine. Este índice representa un valor ponderado por cada valor del índice de Racine y que incluye además el producto de las frecuencias acumuladas, con los tiempos correspondientes de cada comportamiento convulsivo.

Adicionalmente, se evaluaron por separado las frecuencias de aparición de cada categoría comportamental del índice de Racine y los tiempos de permanencia acumulada en cada uno de los comportamientos de tipo convulsivo.

4. RESULTADOS

4.1. Manifestaciones comportamentales durante el confinamiento

Un ANOVA de 2 factores (lugar y tiempo de confinamiento) de las entradas a los lugares mostró diferencias significativas en las entradas a cada uno de ellos por parte de los animales ($F(2,99)=20.854$ $p<0.01$), pero no se encontraron diferencias significativas relacionadas con el tiempo de confinamiento ni interacciones entre los factores. Las entradas relativas también mostraron diferencias de entradas a cada uno de ellos ($F(2,99)=486.02$ $p<0.01$). Comparaciones múltiples (Bonferroni) indicaron que no hubo diferencias significativas en el número de entradas cuando se compararon los lugares 1 y 3, sin embargo el número de entradas al lugar 2 (sin olvidar que el lugar 2 es paso obligatorio entre 1 y 3) fue mayor que las entradas a los lugares 1 y 3 (Figura 1 A). Considerando que este análisis podría apuntar más a la actividad exploratoria, evaluada por la cantidad total de cruzamientos entre los 3 lugares y que un confinamiento de 10 minutos permitiría que estos animales presentaran un mayor número de cruzamientos, se procedió a comparar esta variable (número de entradas) en los animales confinados por 5 y por 10 minutos. El test de Mann-Whitney, indicó que no hubo diferencias significativas entre los cruzamientos totales de los dos grupos ($T=292.5$, $p=0.668$).

Al analizar la variable tiempo de permanencia en cada uno de los lugares con respecto al tiempo de confinamiento, se encontraron diferencias atribuibles tanto al lugar ($F(2,99)=78.601$, $p<0.01$) como al confinamiento. Ya que el tiempo de confinamiento de los 2 grupos que pasaron por este protocolo difiere en la duración total (5 y 10 minutos), se procedió a evaluar la influencia del tiempo experimental y del lugar del brazo abierto, sobre los tiempos relativos (en porcentaje) de permanencia en los mismos (ANOVA de 2 factores). En los casos en que hubo diferencias significativas se procedió a realizar las comparaciones

múltiples corregidas. No se encontraron diferencias entre los porcentajes de tiempos de permanencia en los lugares 2 y 3 ni cuando los animales se confinaron 5 minutos, tampoco cuando se confinaron 10 minutos. Las diferencias se encontraron asociadas al lugar 1, de manera que tanto en el grupo confinado 5 minutos como en el grupo confinado 10 minutos, los animales permanecieron más tiempo en este lugar que en los lugares 2 y 3 ($F(2,99) = 1133.33$ $p < 0.01$). Si bien los animales confinados por 10 minutos permanecieron por un mayor tiempo (en porcentaje) en el lugar 1 que aquellos confinados por 5 minutos, esto solo obedece a un mayor tiempo de exposición en experimento de los mismos (Figura 1 B).

4.2. Efecto del confinamiento en el brazo abierto del LCE sobre la severidad de las crisis convulsivas:

Con base en un abordaje convencional de la severidad de las crisis convulsivas, se procedió a analizar el efecto del confinamiento en el BA sobre el índice máximo de Racine.

Un análisis de Kuskal-Wallis sobre el puntaje máximo de Racine no indicó diferencias significativas entre los animales con 0, 5 y 10 minutos de confinamiento en el BA ($H(2,26) = 2.043$, $p = 0.36$).

El mismo análisis de varianza no paramétrico sobre cada uno de los otros parámetros de severidad de las crisis convulsivas se resume en la tabla 3.

En todos los casos de comparaciones múltiples, los valores del grupo de animales que no fue confinado al laberinto (G0) fueron mayores que los del grupo confinado por 10 minutos en los brazos abiertos (G10) evidenciado luego de aplicar una prueba *post hoc* de Dunn's. (Figura 2)

Tomando en consideración que la tendencia de los valores que mostraron ser significativos fue progresivamente decreciente, en función del tiempo de confinamiento y los poderes de las pruebas fueron bajos por el tamaño de las muestras, además de no haber detectado diferencias significativas entre el grupo de 5 minutos con el de 10 minutos, se procedió a agrupar todos los animales que fueron confinados en un solo grupo, para compararlos con los no confinados

utilizando una prueba de Mann-Whitney (ver tabla 4). En este caso se evidenció al igual que en la tabla 3, que los puntajes máximos de Racine no fueron lo suficientemente sensibles para detectar diferencias entre los grupos y una vez más, los animales no confinados fueron los que presentaron valores convulsivos más altos. (Tabla 4)

4.3. Efectos del confinamiento sobre la memoria

Con el fin de evaluar los efectos del confinamiento en el brazo abierto, sobre la exploración de los brazos abiertos en una segunda exposición de los animales al laberinto completo, se realizó un análisis de Kruskal-Wallis con los animales que recibieron solución salina después del confinamiento, analizando las variables: %EBA y %TBA.

No se encontraron diferencias significativas para la primera variable %EBA ($H(2,26)=1.548$, $p=0.461$), ni para la segunda variable %TBA ($H(2,26)=1.733$, $p=0.4204$).

El mismo tipo de análisis se realizó para evaluar los efectos del confinamiento más PTZ sobre el %EBA y el TBA; en este caso tampoco se encontraron diferencias significativas relacionadas con estas variables ($H(2,26)=1.089$, $p=0.58$ y $H(2,26)=0.60$, $p=0.738$).

Con base en esto se agruparon, por un lado los animales que recibieron la inyección de PTZ más el confinamiento, por otro lado, los que recibieron solución salina después del confinamiento, tampoco se encontraron diferencias significativas para el %EBA ni para %TBA ($p=0.252$ y 0.466 respectivamente).

5. DISCUSIÓN

5.1. Manifestaciones comportamentales durante el confinamiento

Pese a que el protocolo de confinamiento ha sido utilizado con considerable frecuencia en paradigmas como la memoria emocional (Bertoglio y Carobrez 2002) y nocicepción (Mendes-Gomes y Nunes de Souza 2005), muy pocos abordan el comportamiento exhibido por el animal durante el confinamiento. Los animales analizados en este estudio prefirieron permanecer en el lugar proximal

(cerca de la lamina de división) del BA confinado, sin importar si contaron con tiempos breves o extensos de confinamiento.

El que los animales prefieran el lugar proximal a la lamina de división sugiere que el confinamiento al BA estaría siendo un estímulo estresante, en donde el lugar 1 o proximal representaría una menor exposición a un potencial peligro, puesto que, evitan avanzar a lo largo de la plataforma. Circunstancia que podría ser extrapolada a la exploración de una rata en el LCE, en donde se presentan mayores frecuencias y tiempos de permanencia en los BC que en los BA, lo cual tiene lugar alrededor del minuto 3 de la primera exposición (Holmes y Rodgers 2005), permaneciendo desde este momento casi exclusivamente en alguno de los bazos cerrados (Itoh y colaboradores 1990).

Cuando los animales son forzados a permanecer en el BA, presentan manifestaciones de miedo tales como defecación, freezing e incremento de corticosterona en plasma sanguíneo, sin que haya sido identificada plenamente la fuente de dicha aversión (Hogg 1996).

5.2. Efectos del confinamiento sobre la memoria

El confinamiento no mostró ser un factor que altere el comportamiento asociado con memoria emocional en una exposición al LCE completo, puesto que, los %EBA y los %TBA de las ratas confinadas, no mostraron diferencias significativas con respecto a las que no fueron confinadas, respuesta que se mantuvo incluso cuando se realizó la misma comparación con ratas inyectadas con PTZ.

Ahora bien, File y colaboradores en 1990 afirman que el BA es capaz de generar aversión por si solo, por lo que el confinamiento al mismo representa una experiencia altamente estresante, que se puede observar (en sus estudios) por una menor exploración a los BA del LCE completo en una segunda exposición. Por otro lado Frussa-Filho y Ribeiro en 2002 ; Bertoglio y Carobrez 2002, sostienen que la naturaleza aversiva del BA es aun discutida, puesto que en sus trabajos no se presentó un aumento de la evitación al BA en la exposición al LCE con previo confinamiento al BA. Son Bertoglio y Carobrez en 2000 quienes plantean la necesidad de la exposición del animal a los dos ambientes del

laberinto para que se construya una aversión a uno de estos, lo cual cobra sentido si entendemos que el LCE representa como novedad un estímulo potencialmente aversivo y que solo cuando el animal compara estos dos ambientes se pueden esperar cambios de los TBA y %EBA en una exposición posterior al laberinto completo.

Nuestros resultados estarían acorde con lo propuesto con File y colaboradores 1990 en el sentido que el confinamiento al BA es un estímulo estresante, pero discrepamos en la forma en como ellos evalúan dicho estrés, puesto que como se vio en este trabajo el BA representa un estímulo estresante para los animales, sin que esto repercuta en la memoria y en consecuencia el confinamiento constituiría un estímulo ansiogénico, que a su vez diferiría de estados fóbicos o de tipo miedo (File y colaboradores 1992), ya que estos últimos fenómenos (fobia, miedo) comprometen procesos mnemónicos, evocando experiencias aversivas que en este caso se evidenciarían con la evitación a los BA.

5.3. Efecto del confinamiento en el brazo abierto del LCE sobre la severidad de las crisis convulsivas.

Cuando se analizó el efecto del confinamiento en el BA sobre el desarrollo de crisis convulsivas, quedó claro que bajo un abordaje convencional (nivel máximo de Racine) no se encontraron relaciones que indiquen dicho efecto, no siendo así cuando se evaluó la duración y la frecuencia de estos comportamientos.

Al comienzo de nuestra investigación sabiendo de la existencia de un fuerte solapamiento de la epilepsia y la ansiedad a diversos niveles, se planteó como hipótesis que aquellos animales sometidos a un estímulo estresante, mostrarían crisis convulsivas más severas que aquellos que no presentasen dicho estímulo, sin embargo este no fue el caso. Los resultados sugieren que el confinamiento en un brazo abierto previo a la inyección del PTZ produciría un efecto de tipo protector contra la severidad de las crisis convulsivas. Resulta interesante anotar cómo en estudios en ratones susceptibles genéticamente a crisis inducidas por agonista inverso GABAérgico, los animales resistentes presentan mayores indicadores comportamentales de ansiedad mientras que los de mayor

susceptibilidad convulsiva presentan menores indicadores de ansiedad (evaluación realizada en varios modelos incluyendo el LCE) (Chapoutier y Venault 2001). Estos resultados parecerían estar en la misma dirección de los obtenidos en el presente estudio, sin embargo, ninguno de estos resultados parecen estar de acuerdo con las manifestaciones de tipo ansioso y/o depresivo presentadas en los pacientes epilépticos. No obstante, en el presente trabajo, el abordaje experimental fue contrario a los experimentos de Chapoutier y Venault, en el sentido de que aquí se pretendió estudiar el efecto de diferentes niveles de estrés inducido, sobre la severidad de las crisis convulsivas. Este mismo abordaje aún resultaría interesante de ser realizado en un modelo de animales susceptibles a crisis convulsivas. Si los mecanismos de las convulsiones estuvieran directamente relacionados con los de la ansiogenidad, se esperaría que los animales susceptibles no presentaran las manifestaciones de la “protección” contra la severidad de las crisis.

6. CONCLUSIONES

El confinamiento a los brazos abiertos del LCE utilizado como inductor de estrés en ratas no susceptibles genéticamente crisis convulsivas, disminuye significativamente la severidad de tales manifestaciones convulsivas inducidas por PTZ.

Los tiempos de confinamiento en los brazos abiertos del LCE utilizados en este experimento, no permitieron evidenciar un efecto mnemónico claro, lo cual debe tomarse en consideración para efecto de posibles interpretaciones a trastornos de tipo fobia.

7. RECOMENDACIONES

Estudios posteriores podrían evaluar el desarrollo de las crisis convulsivas en líneas genéticas susceptibles a manifestaciones ansiogenicas, así como en aquellas sometidas a un estrés crónico, teniendo en cuenta los resultados de Chapoutier y Venault en 2001, trabajo que fue orientado de manera inversa.

Seria igualmente interesante evaluar el efecto del confinamiento al BA, en el desarrollo de crisis convulsivas provocadas por el PTZ tanto en dosis crónicas como agudas, permitiendo establecer si el confinamiento disminuye la severidad de las crisis indistintamente al modo de administración de este fármaco.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Blanchard DC; Williams G; Lee EMC; Blanchard RJ: Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central grey. *Physiological psychology* 1981; 9:157-163.
2. Garcia-Cairasco N; Terra VC; Tsutsui JAC: Audiogenic-like and flight behavior after collicular bicuculline are blocked by nigral clobazepam and intercollicular transactions. *Proceedings of the American epilepsy society meeting. Epilepsia* 1989; 30:708.
3. Tomaz C, Brandao M, Garcia-Cairasco N. Overlapping neural substrates underlying defense reactions, aversive memory, and convulsive behavior. *Neurotransmitter interactions and cognitive function* 1992; 15: 240-256
4. Chapoutier G, Venault P. A pharmacological link between epilepsy and anxiety? *Trends in Pharmacological Sciences* 2001; 22: 491-493.
5. File SE: Short-term rebound anxiolytic effects and long-term changes in platelet benzodiazepine binding at 13 pentylentetrazole-kindling in two strains of rats. *Anxiety* 1996; 2: 109-116.
6. Mensah SA, Beavis JM, Thapar AK, Kerr MP. A community study of the presence of anxiety disorder in people with epilepsy. *Epilepsy and behaviour* 2007; 11(1):118-24.
7. Jacoby A, Backer GA, Steen N. The clinical course of epilepsy and its psychological correlates: findings from a U.K. community study. *Epilepsia* 1996; 37:148-61.
8. Conde CA, Costa V, Tomaz C. Measuring emotional memory in the elevated T maze using training to criterion procedure. *Pharmacology biochemistry and behavior* 1999; 63:63-69.

9. Crawley JN. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1981; 15 (5):695-9.
10. File SE, Hyde JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *British Journal of Pharmacology* 1978; 62 (1):19-24.
11. Pellow S, Chopin P, File S.E, Briley M. Validation of open, closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1985; 14: 149-167.
12. Carobrez A.P, Bertoglio L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behaviour: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2005; 29:1193-1205
13. File SE: The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research* 1993; 58:199-202.
14. Imhof JT, Coelho ZMI, Schmitt ML, Morato GS, Carobrez AP. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus-maze apparatus. *Behavioral Brain Research* 1993; 56: 177-180.
15. Garcia AM, Cardenas FP, Morato S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology Behavior* 2005; 85: 265-270.
16. File SE, Mabbutt PS, Hitchcott PK. Characterisation of the phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 1990; 102:98-101.
17. Griebel G, Moreau JL, Jenck F, Martin J], Misslin R. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behavioural Processes* 1993; 29: 37-48.
18. Rodin EA. Metrazol tolerance in a “normal” and volunteer population. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology* 1958; 10:433-46.
19. Venault P, Chapouthier G, Prado de Carvalho L, Rossier J. Effects of convulsant ligands of the GABA-benzodiazepine receptor complex in conflict and learning tasks in mice. *L'Évolution* 1992; 18(6):655-60.

20. Racine R. Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. After-discharge threshold. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 1972; 32(3):269- 79.
21. Racine R. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 1972; 32(3):281-94
22. Conde C, Costa V, Tomaz C: PROSTCOM. Un Conjunto de Programas Para Registro Y Procesamiento de datos Comportamentales en Investigaciones de Fisiología Y Farmacología *Biotemas* 2000; 13(1); 145-159.
23. Bertoglio LJ, Carobrez AP. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2002; 72:449–455.
24. Mendes-Gomes J, Nunes-de-Souza R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. *Brain Research* 2005; 1047: 97 – 104
25. Holmes A, Rodgers R.J. Responses of Swiss–Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1998; 60,2. 473–488.
26. Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T. Utility of an elevated plus-maze for evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine, and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology* 1990; 101:525–32.
27. Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996; 54:21–30.
28. Frussa-Filho R, Ribeiro R. 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 Sciences* 2002; 71:519-525

29. Bertoglio LJ, Carobrez AP. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Research* 2000; 108:197–203
30. File SE, Zangrossi H, Viana M, Graeff FG. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology* 1992; 111: 491-494.

Figuras

Figura 1

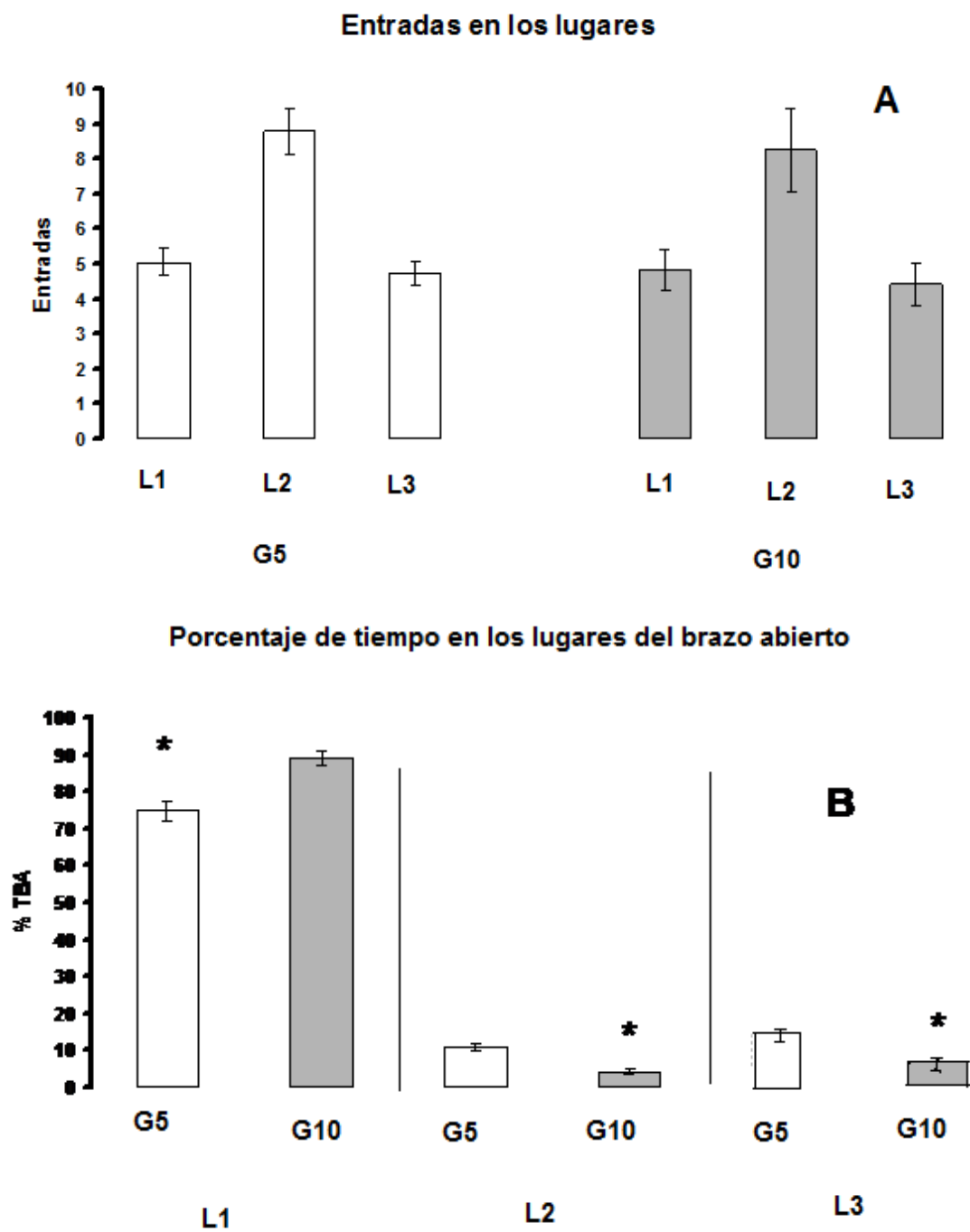
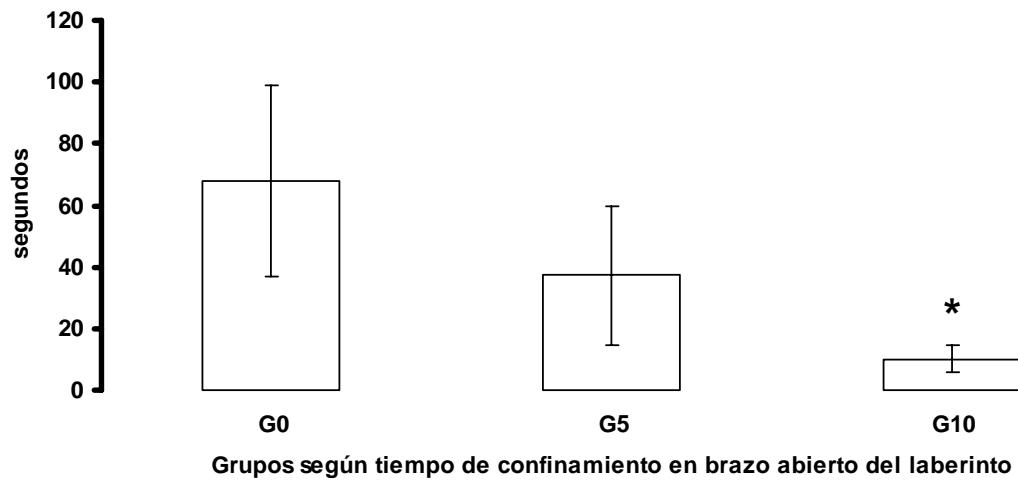


Figura 2

SUMATORIA DE TIEMPOS EN COMPORTAMIENTOS CONVULSIVOS



Tablas

Tabla 1

Comportamientos		índice
FA	automatismos faciales	1
MC	mioclonias de la cabeza	2
CUB	clonias unilateral y bilateral de extremidades	3
CUE	clonias uni o bilateral con levantamientos (rearing)	4
SG	levantamientos, caídas y convulsión tónico-clónica generalizada	5

Tabla 2

Fármaco	Tiempo de confinamiento			Total
	G0	G5	G10	
PTZ	8	7	7	22
SS	8	9	8	25
TOTAL	16	16	15	47

Tabla 3

Kruskal-Wallis			
Variable	H (2 grados de libertad)	p	Dunn's
Frecuencias			
FA(1)	2.366	0.306	-
MC(2)	9.927	* 0.007	0 >10
CUB(3)	5.175	0.075	-
CUE(4)	0.979	0.613	-
SG(5)	0	1	-
SF	9.371	* 0.009	0 > 10
Tiempos			
FA(1)	3.232	0.199	-
MC(2)	4.616	0.099	-
CUB(3)	6.784	0.034	-
CUE(4)	0.979	0.613	-
SG(5)	0.005	0.998	-
ST	8.355	* 0.034	0 > 10
IS	10.062	* 0.007	0 > 10

Tabla 4

Mann-Witney				
Variable	T	Npeq	Ngran	P
Frecuencias				
FA(1)	111500	8	14	0.195
MC(2)	136500	8	14	*0.003
CUB(3)	124000	8	14	*0.032
CUE(4)	95500	8	14	0.835
SG(5)	92000	8	14	0.972
SF	134500	8	14	*0.004
Tiempos				
FA(1)	54000	8	14	*0.01
MC(2)	122000	8	14	*0.044
CUB(3)	128000	8	14	*0.015
CUE(4)	95600	8	14	0.835
SG(5)	92000	8	14	0.972
ST	130000	8	14	*0.01
IS	134000	8	14	*0.005