



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación

Trabajo Fin de Grado

Análisis etológico de la conducta de ratas inyectadas con Yohimbina.

Alumno: María del Castillo López García

Tutor: M^a Lourdes de la Torre Vacas
Ángeles Agüero Zapata
Dpto: Psicobiología

Septiembre, 2015

ÍNDICE

Resumen Abstract y palabras clave.....	3
1. Introducción	5
1.1. Modelos animales de estrés	5
1.2. Evaluación del efecto ansiogénico de la Yohimbina en animales	9
1.3. Actualización del laberinto elevado como modelo animal de estrés y ansiedad	11
2. Metodología	15
2.1. Sujetos	15
2.2. Aparato	15
2.3. Fármaco	16
2.4. Procedimiento	16
2.5. Variables dependientes	17
3. Resultados	17
4. Discusión	19
5. Conclusión	21
6. Bibliografía	22
Anexo	25

Resumen.

La Yohimbina es uno de los fármacos más utilizados en modelos animales de estrés, para generar en el animal un estado ansiogénico. Los efectos conductuales de dicho fármaco pueden ser examinados a través de diversas pruebas conductuales, siendo el Laberinto Elevado en Cruz (LEC) una de las pruebas más utilizadas para tal fin. Posiblemente, las medidas clásicas obtenidas en el LEC han dado lugar a una amplia gama de resultados inconsistentes y contradictorios.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto ansiogénico de la Yohimbina a través del examen de la conducta exploratoria de los animales en el LEC, y probar la hipótesis, sugerida por algunos autores recientemente, de que el análisis etológico detallado (minuto a minuto) de la conducta de los animales puede contribuir a reducir los falsos negativos (aquellos casos en los que el fármaco no proporciona resultados significativos con las medidas clásicas).

Los resultados obtenidos demostraron que la Yohimbina tuvo un efecto ansiogénico en las conductas de evaluación de riesgos de Inmovilización y Vuelta a brazo cerrado en el grupo experimental. En el grupo control se obtuvieron resultados significativos en las conductas de: Hdnp (Head-dipping no protegido), Rearing, Tiempo Rearing, Tiempo Hdnp, Sapnp (del inglés, stretched attend posture) y EBC (entrada brazo cerrado), mostrando los animales mayores índices de tranquilidad. Respecto a los parámetros clásicos (entradas a brazo abierto y cerrado y tiempo de permanencia en cada uno de ellos) no se obtuvo ningún resultado significativo.

Estos resultados parecen poner de manifiesto la utilidad de introducir un análisis etológico de la conducta de los animales en el LEC para evitar los falsos negativos respecto a los efectos de determinados fármacos. Nuestros resultados ponen de manifiesto, concretamente, que la dosis seleccionada y empleada del fármaco Yohimbina tuvo un efecto ansiógeno, que no fue detectado a través del examen de las conductas clásicas en el LEC, y que, sin embargo, se evidenció a través del estudio detallado de las conductas de evaluación de riesgo de los animales en dicho aparato.

Palabras clave: Yohimbina, estrés, ansiedad, modelos animales, laberinto elevado en cruz.

Abstract.

Yohimbine is one of the drugs most frequently used among animals to generate an anxiogenic state. The behavioural effects of this drug can be examined through different tests, such as the Elevated Plus-Maze (EMP), this being one of tests most commonly used for such a process. Perhaps due to this fact, the EMP produces a wide variety of inconsistent and contradictory results.

The aim of this project is to evaluate the anxiogenic effects of Yohimbine through an analysis of the exploratory behaviour of animals in the EMP, and to test the hypothesis, which has been recently suggested by several researchers, that the detailed (minute by minute) ethological analysis of the behaviour of such animals may contribute to reduce the incidence of false negatives (the drug does not provide significant results following classical evaluative methods).

The results show that the Yohimbine had an anxiogenic effect on some of the risk assessment behaviours of Immobilization and Return to closed arms, In the control group behaviors significant results were obtained in: Hdnp (Head-dipping unprotected), Rearing, Rearing Time, Time Hdnp, Sapnp (stretched attend posture) and EBC (entrance closed arm), animals showing higher rates of tranquility . Respect to the traditional parameters (open and closed arm entries and permanence time in each category) did not provide significant results.

These results suggest the convenience of using an ethological analysis of the behaviour of animals in the EMP in order to avoid false negatives of drugs. Concretely, our results show that the selected and used dosage of the drug Yohimbine had an anxiogenic effect that was not detected through the traditional exams of animal behavior in EPM, and that, however, was observed through a detailed analysis of the risk assessment behaviours.

Keywords: Yohimbine, stress, anxiety, animal tests, Elevated Plus-Maze.

1. Introducción

El estrés es una reacción normal y necesaria ante situaciones o demandas de la vida cotidiana. Pero cuando este estrés se vuelve crónico, persistente y repetido, puede tener consecuencias negativas en la salud física y mental de los sujetos, tales como, alteraciones cardiovasculares e hipertensión, úlcera péptica, dolores musculares, asma, jaquecas, etc., y también puede incrementar la posibilidad de contraer una enfermedad (como la depresión, por ejemplo), provocando una pérdida de la calidad de vida, en general (Cockerham, 2001).

Uno de los problemas más importantes que puede conllevar el padecimiento del estrés es el aumento del consumo de drogas. De hecho, el estrés y la ansiedad se consideran los factores de riesgo más importantes para iniciar una conducta de consumo de drogas. Por tanto, el estudio del estrés y sus posibles interacciones con otros factores biológicos en la determinación de la conducta de ingesta de sustancias psicoestimulantes se ha convertido en objeto de interés de numerosos grupos de investigación (Kumar, Ali Bhat y Kumar, 2013). Por lo que resulta interesante producir estrés en animales mediante fármacos, como se trata en el presente estudio.

1.1. Modelos animales de estrés

Existen un gran número de modelos animales utilizados en el laboratorio para estudiar la reacción de estrés o ansiedad en animales. Cabe aquí aclarar la diferencia entre ansiedad y estrés, ya que son dos conceptos ligeramente diferentes. Estrés se entiende como la respuesta o mecanismo general de activación fisiológica y de los procesos cognitivos que permite al organismo hacer frente a cualquier estresor. Por el contrario, el miedo/ansiedad se refiere a una emoción, es decir, una de las etiquetas cognitivas que recibe esta activación fisiológica generada cuando se pone en funcionamiento el mecanismo adaptativo denominado respuesta de estrés (Piqueras et al., 2008, revisado en De la Torre, Escarabajal y Agüero, 2011). Así, podríamos decir que cuando la respuesta de estrés no conlleva una correcta adaptación al entorno, cuando se mantiene a pesar de que haya desaparecido el estímulo o los estímulos que la provocaron, y/o es interpretada por el sujeto como algo negativo, e incluso aversivo, dicha respuesta puede convertirse en un estado de miedo o ansiedad.

El modelo animal de ansiedad más utilizado es el de estimulación eléctrica de la superficie de apoyo, este sería un tipo de modelo animal de ansiedad en el que se utilizan estímulos dolorosos (Alonso y Navarro, 1993, citado en De la Torre et al., 2011). Existen otros tipos de modelos animales en el que los estímulos utilizados también son dolorosos, pero su componente principal es psicológico no físico son, por ejemplo, la derrota social o la separación maternal. También se han utilizado los estímulos de naturaleza farmacológica capaces de provocar un estado de ansiedad o estrés en los animales (revisado en De la Torre et al., 2011).

Son numerosos los fármacos y drogas que se han empleado para inducir estrés en animales, como por ejemplo, la Cocaína o la Heroína (Yap y Miczek, 2009) y la Buspirona (Graeff, Netto y Zangrossi, 1998). La yohimbina es uno de los fármacos que más se han utilizado por sus demostrados efectos ansiogénicos tanto en humanos como en animales (Baldwin, Johnston y File 1988; Wada y Fukuda, 1991).

Los efectos ansiogénicos de la Yohimbina en animales pueden ser evaluados a través de distintas pruebas conductuales de laboratorio, entre las que cabe destacar el laberinto elevado en cruz (LEC). El LEC es uno de los más populares, desarrollado primero para ratas y más recientemente para otras especies tales como hámster, ratones de campo y cobayas (Kumar et al., 2013). El laberinto elevado, como prueba para medir estrés/ansiedad/miedo, se basa en la aversión natural de los roedores a los espacios abiertos y utiliza el conflicto entre la exploración y la aversión a los lugares abiertos. Existen dos variantes de este modelo, el laberinto elevado en cruz y el laberinto elevado en cero (Cárdenas y Navarro, 2002). Dado que el LEC ha sido la prueba conductual empleada en este trabajo de investigación para evaluar los efectos ansiogénicos del fármaco administrado (Yohimbina) a los animales, en apartados posteriores será descrita con mayor detalle.

Otras pruebas conductuales que pueden ser empleadas para evaluar el efecto ansiogénico/estresante de los fármacos sobre la conducta de los animales son, por ejemplo, el campo abierto, la prueba de interacción social, la respuesta de sobre salto, natación forzada, suspensión de la cola, prueba de luz-oscuridad y prueba de la habitación con espejo, entre otras. A continuación describiremos brevemente algunas de ellas.

La *prueba de campo abierto* (ver figura 1) es una de las pruebas más antiguas, y es utilizada para observar la actividad motora general de exploración, y registrar diferentes medidas exploratorias (o de no exploración), como locomoción, olfateo y

rearing (el animal se levanta apoyado en sus patas traseras) y registrar medidas de miedo como inmovilización, grooming (acicalamiento) o micción (Cárdenas y Navarro, 2002).



Figura 1: Prueba de campo abierto, extraída de www.google.com

La prueba de *interacción social* (ver figura 2) consiste en introducir a una pareja de ratas en un ambiente no familiar, en condiciones de baja o alta iluminación y se toman medidas de los siguientes parámetros: interacción social, como por ejemplo, olfateo, aseo, golpeo, lucha y salto y locomoción exploratoria. Según Cárdenas y Navarro, (2002) estas conductas pueden inhibirse cuando se incrementa la ansiedad.



Figura 2: Test de interacción social, extraída de www.google.com

La *respuesta de sobresalto acústico* consiste en una serie de movimientos rápidos que comienza en la cabeza del animal, que involucran la contracción y extensión de los principales grupos musculares en respuesta a estímulos auditivos.

La respuesta de sobresalto se puede utilizar para determinar los sitios y los mecanismos de acción del fármaco utilizado en la prueba (Sipes y Geyer, 1995).

En el *test del tablero agujereado* (ver figura 3) se coloca al animal en una base cuadriculada en la que hay un número de agujeros. El test se basa en la premisa de una tendencia innata de respuesta de Head-dip (el animal introduce la cabeza por los agujeros del tablero para explorar) que tienen los animales. Las medidas que se evalúan son: número de Head-dipping, número de Rearing y número de recuadros del tablero que recorre, que proporciona una medida del nivel de actividad general. El efecto de los fármacos ansiolíticos, se vería reflejada en un aumento del número de Head-dipping, mientras que un efecto ansiogénico sería lo contrario, una disminución de la actividad general (Kumar, et al., 2013).



Figura 3: Test del tablero agujereado., extraída de www.dreamstime.com

La *natación forzada* es un modelo para evaluar la actividad antidepresiva y antiestrés de ciertos fármacos, provocando una situación de estrés en el animal. El aparato consiste en un cilindro transparente, con 15 cm de agua (ver Figura 4). En animal se coloca durante cinco minutos en el cilindro y se registra el tiempo de inmovilidad. Se sugiere que la inmovilidad refleja un estado de ánimo en que los animales han perdido la esperanza de encontrar una salida.

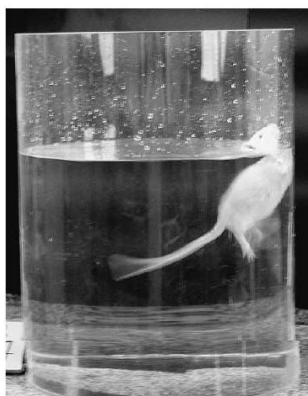


Figura 4: Test de natación forzada, extraída de www.google.com

1.2. Evaluación del efecto ansiogénico de la Yohimbina en animales

La Yohimbina es un antagonista de los receptores adrenérgicos α_2 , que aumenta tanto la liberación de noradrenalina (NA) en varias áreas del cerebro, como los niveles de glucocorticoides, en ratas así como en seres humanos, provocando un incremento en la ansiedad subjetiva y activando las medidas autonómicas de estrés (Bremner, Krystal, Southwick, y Charney, 1996).

Baldwin, Johnston y File (1989), llevaron a cabo uno de los primeros estudios realizados sobre el tema. Los autores utilizaron la Yohimbina para comprobar si una dosis de este fármaco reducía el porcentaje de entradas y tiempo en los brazos abiertos del LEC. Comenzaron con una dosis de 2,5 mg/kg pero encontraron que las ratas eran insensibles a esta dosis por lo que la aumentaron hasta 4 mg/kg. Las ratas recibieron las inyecciones 30 minutos antes de la prueba. Los resultados demostraron que la Yohimbina redujo tanto el porcentaje de entradas en los brazos abiertos así como el porcentaje de tiempo dedicado a los brazos abiertos. Otros estudios han encontrado resultados similares en relación con el efecto de la Yohimbina sobre la conducta exploratoria de los animales en el LEC (Yeung, Lu, Hughes, Treit y Dickson, 2013; Sorregotti, Mendes-Gomes, Rico, Rodgers, y Nunes-de-Souza, 2013).

Los efectos ansiogénicos de la Yohimbina también se han observado en otras pruebas conductuales. Por ejemplo, Baldwin y colaboradores (1988), realizaron un estudio en el que querían comprobar los efectos de la Yohimbina y de la Cafeína en la prueba de interacción social. Los resultados demostraron que la Cafeína redujo significativamente los niveles de interacción social, indicando un efecto ansiogénico

de la misma en esta prueba. Sin embargo, la Yohimbina, no produjo ningún cambio en los niveles de interacción social de las ratas, lo que sugiere que el fármaco no tuvo un efecto ansiogénico en esta prueba.

En humanos, se realizó un estudio para evaluar la influencia de la Yohimbina en la impulsividad. Los sujetos tomaron distintas dosis de Yohimbina y luego se evaluó la impulsividad a través de una prueba de memoria inmediata. Se concluyó que la Yohimbina no alteró significativamente los aciertos de los dígitos, pero sí aumentó la velocidad de las respuestas impulsivas (Swann, Birnbaum, Jagar, Dougherty y Moeller, 2005).

La Yohimbina también se ha utilizado en estudios donde se analizan los efectos del estrés sobre el consumo de ciertas drogas, como por ejemplo el alcohol. En sujetos desintoxicados recientemente, la Yohimbina aumenta la ansiedad y el cortisol, que es una hormona producida por la glándula suprarrenal y se libera como respuesta al estrés. En modelos animales de interacción entre estrés y alcohol, la Yohimbina se ha utilizado ampliamente para provocar estados de estrés y ansiedad, poniendo de relieve la principal ventaja de usar un modelo de estrés inducido farmacológicamente, al actuar a través de similares mecanismos neurobiológicos tanto en animales como en humanos (Tjurmina, Goldstein, Palkovits y Kopin, 1999).

Existen estudios en los que se estudia el posible efecto del estrés sobre otras drogas de abuso. Por ejemplo, Kelly y colaboradores (2010), llevaron a cabo un estudio en el que querían comprobar como la exposición a ciertos factores de estrés aumentaban la posibilidad de recaídas y aumentaba la búsqueda de heroína. Para ello indujeron estrés farmacológicamente, utilizando determinadas dosis de Yohimbina. Los resultados demostraron, que el estrés inducido por la Yohimbina aumentó significativamente el restablecimiento de la búsqueda de la heroína tras las sesiones de extinción.

En definitiva, la Yohimbina ha sido un fármaco ampliamente empleado para inducir un estado de estrés o ansiedad en animales de laboratorio, con objeto bien de estudiar la respuesta de estrés en sí misma, o bien de explorar las interacciones entre el estrés y otros factores (como el efecto de drogas de abuso).

1.3. Actualización del laberinto elevado como un modelo animal de estrés/ansiedad

Como se ha mencionado en apartados previos, el laberinto elevado en cruz (LEC) es, probablemente, el más popular y utilizado de los modelos animales de ansiedad. Consta de 4 brazos y en el centro hay un pequeño recuadro. Dos de los brazos son cerrados, con paredes situadas a los lados y los otros dos brazos son abiertos (ver figura 5). Muchos son los fármacos y drogas utilizados con esta prueba, para evaluar su influencia en la conducta exploratoria de los animales.



Figura 5: *Laberinto elevado en cruz, extraída de www.google.com*

Las medidas que se han utilizado clásicamente para examinar las diferencias en la conducta de los animales en el LEC son: número de entradas en los brazos abiertos, número de entradas en los brazos cerrados, tiempo que pasa el animal en los brazos abiertos, tiempo que pasa el animal en los brazos cerrados, tiempo que pasa el animal en el centro del laberinto y número total de entradas en los distintos brazos.

Amanda y colaboradores (2010) quisieron comparar el efecto ansiolítico o ansiogénico que tenían varios fármacos sobre el comportamiento de las ratas, tanto en el LEC, como en el laberinto elevado en cero. Esta variante del modelo consta de una plataforma en círculo que se divide en cuatro entrantes, dos de ellos protegidos y los otros dos desprotegidos. La diferencia con el LEC, es que el laberinto elevado en cero no consta del recuadro rectangular de distribución de brazos abiertos y cerrados, en el que se ha comprobado que los animales pasan una alta tasa de tiempo (Shepherd, Grewal, Fletcher, Bill, Dourish, 1994) lo que se considera un problema metodológico del aparato (ver figura 6).



Figura 6: *laberinto elevado en cero*, extraída de www.google.com

Los resultados obtenidos por Amanda y colaboradores (2010) indicaron que, tanto el LEC como el cero fueron igualmente eficaces para comprobar los efectos ansiogénicos de la Yohimbina (2,5 mg/kg) y de la cafeína (100 mg/kg), así como los efectos ansiolíticos del Diazepam (1 mg/kg). El único hallazgo discrepante entre laberintos fue que los grupos tratados con Diazepam mostraron un menor número de entradas a los brazos cerrados del LEC, lo cual no se observó en el Cero.

La existencia de este tipo de problemas metodológicos, así como el hecho de que, en ocasiones, los resultados obtenidos a partir del LEC son inconsistentes e, incluso, contradictorios, ha dado lugar en los últimos años a que se creen variantes del aparato, como la que hemos mencionado anteriormente, o que se lleve a cabo un análisis etológico de la conducta exploratoria de los animales en el mismo.

En los años 90 Sandy Hogg (1996) elaboró un cuestionario que se distribuyó a 65 laboratorios que utilizaban el LEC. Su objetivo era investigar si las sensibilidades farmacológicas podrían estar correlacionadas con las diferentes características del laberinto o con los procedimientos de ensayo empleados. Los resultados del cuestionario pusieron de relieve que el aspecto más importante que había que cuidar para evitar resultados inconsistentes en el laberinto elevado era la forma en la que las medidas debían ser registradas (por ejemplo, si se consideraba entrada al brazo cuando entran con las cuatro patas o solo con las dos patas delanteras).

Además de esta unificación de criterios a la hora de evaluar las conductas, varias investigaciones (Cárdenas y Navarro, 2002; Suzanne, Peter, Pothuizen y Spruijt, 2015; Roy y Chapillon, 2004) han sugerido que la realización de un análisis detallado, minuto a minuto, de las conductas de evaluación de riesgo de los animales, contribuirá a incrementar la consistencia de los resultados, y a reducir los

falsos negativos. En los últimos años la discusión sobre la validez de utilizar unas medidas u otras, tiene mayor intensidad debido a los errores en los ensayos clínicos de nuevos fármacos psicoactivos, además de la existencia de falsos negativos con las medidas clásicas, como se ha explicado anteriormente.

Cárdenas y Navarro (2002), sugirieron una serie de parámetros etológicos, o conductas de evaluación de riesgo, para mejorar la sensibilidad del test, su fiabilidad y su validez ecológica. El primero de ellos es *Head-dipping protegido* (ver figura 7) que consiste en que el animal saca la cabeza por debajo del nivel de los brazos del laberinto. Una frecuencia alta de esta conducta sugiere cierto miedo de los animales. Existe también el *Head-dipping no protegido*, en el que la conducta se realiza en los brazos abiertos y muestra cierta tranquilidad de los animales. Otra medida etológica es el *SAP protegido* (del inglés, stretched attend posture) (ver figura 8) en la que el animal se estira en toda su longitud y explora olfateando sin moverse del sitio. Esta conducta es sinónimo de miedo. También tiene su variante de *SAP no protegido*, que se realiza en los brazos abiertos y en este caso indica desconfianza por parte del animal. El *Rearing* (ver figura 9) es otro de los nuevos parámetros, que consiste en que el animal se levanta apoyado en sus dos patas traseras para explorar las paredes y se interpreta como la exploración del espacio por parte del animal, por lo que un número elevado de Rearing indica un bajo nivel de estrés/ansiedad por parte del animal. La *Inmovilización*, es un parámetro que indica el nivel general de actividad por parte del animal. Mayor tiempo de Inmovilización, mayor miedo o ansiedad expresada por el animal. Por último, *vuelta al brazo cerrado*, el animal mantiene sus dos patas traseras en el brazo cerrado mientras explora el centro del laberinto o un brazo abierto, que indica miedo por parte del animal.



Figura 7: *Head-dipping*, extraída de www.google.com



Figura 8: SAP, extraída de www.google.com



Figura 9: Rearing, extraída de www.google.com

Todos estos índices permiten observar el efecto ansiogénico o ansiolítico de los fármacos administrados.

Como hemos mencionado anteriormente, hay determinadas inconsistencias en los estudios en los que se ha explorado el efecto de la yohimbina tomando en consideración exclusivamente las medidas clásicas en el LEC. Así en el estudio que presentamos en este trabajo se pretende estudiar el efecto de una determinada dosis de Yohimbina, (2,5 mg/kg), en la conducta exploratoria de los animales en el LEC, llevando a cabo un análisis de las conductas de evaluación de riesgo que hemos comentado anteriormente, exhibidas por los animales minuto a minuto y de forma global, a lo largo de toda la duración de la prueba.

Este estudio forma parte de un proyecto de investigación desarrollado por las tutoras del presente trabajo, cuyo objetivo principal era el estudio del posible efecto

del estrés (inducido farmacológicamente mediante Yohimbina) sobre las propiedades reforzantes y aversivas del Etanol.

El experimento que se describe en este trabajo fue realizado por las investigadoras participantes del mencionado proyecto, y el análisis de la conducta exploratoria de los animales inyectados y controles fue llevado a cabo mediante la observación de las medidas clásicas mencionadas anteriormente. Los resultados que se obtuvieron fueron negativos. Por esta razón, se decidió realizar un examen etológico del comportamiento de dichos animales, con objeto de comprobar la posibilidad de que dicho examen pusiera de manifiesto un efecto ansiógeno del fármaco (que no fue detectado a través del análisis de las variables clásicas). Este examen, que incluyó la replicación del estudio de las variables clásicas, es el que se presenta a continuación y en el que la autora de este trabajo ha intervenido, analizando y estudiando dichas conductas de riesgo, extraídas de los videos en los que han sido registradas dichas conductas, como se describe a continuación.

2. Metodología

2.1. Sujetos

Se han utilizado 19 ratas de la cepa wistar, siendo estos machos de edad adulta. Todos los animales fueron ubicados individualmente en cajas de plástico y mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, cuya fase iluminada comenzaba a las 8:00h.

La alimentación de los animales durante todo el experimento consistió en una ración diaria (25-30 g.) de pienso compuesto. Los animales tuvieron acceso a agua ad libitum.

2.2. Aparato

El laberinto elevado consistía en dos brazos abiertos y dos cerrados (con una medida de 49.5 x 10 cm. cada brazo; ver figura 5), con suelo formado por Plexiglás de color negro. Las paredes de los brazos cerrados estaban formadas de plexiglás transparente. El laberinto estaba elevado 50.5 cm. sobre el nivel del suelo. La cámara de video utilizada es de la compañía “CREATIVE”, el modelo n°:VF0690 Socialize HD AF. Este modelo cuenta con la función de autoenfoco.

2.3. Fármacos

La dosis de Yohimbina (Yohimbine hydrochloride; Sigma-Aldrich, España) que se empleó en el experimento, 2.5 mg/kg, fue elegida en base a los hallazgos de diversos grupos de investigación (i.e., Wada y Fukuda, 1991), que ponen de manifiesto la capacidad del fármaco para inducir efectos ansiogénicos, evaluados a partir de la conducta exploratoria de roedores en el laberinto elevado, con dosis comprendidas entre 1,5-3 mg/kg, sin provocar notables efectos secundarios (como espasmos, ataques o convulsiones). La yohimbina fue administrada disuelta en agua destilada, que fue empleada como vehículo para los sujetos del grupo control. Todas las administraciones se llevaron a cabo de forma intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes de la prueba.

2.4. Procedimiento

Las ratas fueron aleatoriamente asignadas a dos grupos: (1) YOH, inyección (i.p.) de 2,5 mg/kg de yohimbina; (2) control, inyección de vehículo (agua destilada).

El día de la prueba, y transcurridos 25 minutos desde la administración i.p. de yohimbina o vehículo, los animales fueron transportados a la sala experimental, en la que se les dejó (en la misma caja empleada para su alojamiento y transporte) durante los 5 minutos previos al comienzo de la realización del test. Una vez finalizado el test los animales fueron colocados de nuevo en la sala de alojamiento.

Con objeto de evaluar el efecto de la exposición repetida al fármaco, a partir del día siguiente a la realización de la primera prueba, todos los animales recibieron una inyección de la dosis correspondiente de yohimbina o de vehículo (control) en días alternantes, durante una semana.

El registro de la conducta de los animales en el laberinto elevado se llevó a cabo mediante el análisis de las grabaciones realizadas en el tiempo de estancia en el laberinto elevado. Los observadores (en este caso la autora de este trabajo) recibieron entrenamiento en las pautas concretas de registro y organización de los datos. Se realizó un análisis temporal detallado (minuto a minuto) del tiempo dedicado a cada conducta y el número de veces que los animales hacían cada comportamiento durante la duración de la prueba (5 minutos).

2.5. Variables dependientes

Las variables dependientes (VD) registradas en este estudio se pueden dividir en dos categorías:

- Conductas clásicas: tiempo de estancia en brazos abiertos (TEBA) y cerrados (TEBC); porcentaje de tiempo de estancia en brazos abiertos respecto al tiempo de estancia total en brazos abiertos y cerrados $((TEBA/(TEBA + TEBC)) * 100)$; porcentaje de tiempo de estancia en brazos cerrados respecto al tiempo de estancia total en brazos abiertos y cerrados $((TEBC/(TEBA + TEBC)) * 100)$; número de entradas a brazos abiertos (EBA) y cerrados (EBC).
- Conductas etológicas: tiempo de estancia en el límite de los brazos abiertos (TELA); porcentaje de tiempo de estancia en el límite de los brazos abiertos respecto al tiempo de estancia total en brazos abiertos y cerrados $((TELA/(TEBA + TEBC)) * 100)$; número de entradas en el límite de los brazos abiertos; número de entradas totales en los brazos abiertos y cerrados; número de vueltas al brazo cerrado (VUELTA); número de Rearing (R); número de Grooming (G); número de Head-dipping (protegido y no protegido, como se describió previamente); número de SAP (protegido y no protegido); y por último, tiempo de inmovilidad (IN). En el presente estudio se realizó un análisis etológico, minuto a minuto, de estas conductas exploratorias de los animales tras la inyección de una dosis de 2,5 mg/kg de Yohimbina. Se hizo un registro minuto a minuto de cada una de estas conductas, así como un registro global de las mismas, durante los 5 minutos que duraba la prueba.

El porcentaje de tiempo estancia y entradas en brazos abiertos se emplean habitualmente como índices de ansiedad, al igual que con el porcentaje de tiempo en el límite de los brazos abiertos; el número total de entradas, suele ser utilizado como un índice de la actividad locomotora general de los animales. El número de veces que realiza la vuelta a brazo cerrado, se utiliza como un índice de miedo. La inmovilidad también se utiliza como un índice de miedo.

3. Resultados

Para estudiar el efecto de la yohimbina sobre la conducta de evaluación de riesgo de los animales en el laberinto elevado, se llevó a cabo un análisis no paramétrico

con el estadístico U de Mann Whitney para cada una de las variables dependientes anteriormente mencionadas. El nivel de significación se estableció en $p < 0,05$. Los resultados solo revelaron diferencias estadísticamente significativas para las VD que aparecen en la tabla 1.

Tabla 1
Resultados significativos U de Mann Witney

Conductas	Media Gr. Control	Media Gr. YOH	U de Mann Witney
Sapnp2	,8889	,1000	,004
Hdp3	1,4444	,1000	,001
Hdp4	,8889	,2000	,033
Hdpt	5,0000	2,3000	,004
Hdnp5	,6667	,0000	,022
R2	2,4444	,8000	,001
R5	2,8889	1,2000	,002
Rt	10,6667	6,0000	,001
Tsapnp2	,2944	,0220	,003
Thdnp1	,4378	,0440	,038
Thdnp5	,3367	,0000	,022
Thdp3	,6822	,0930	,003
Thdp4	,5178	,1300	,037
Thdpt	25,7289	9,4690	,000
Tr5	,7378	,3770	,025
Trt	2,7856	1,9460	,045
EBC	7,0000	5,1000	,011
Etotal	11,3333	8,1000	,026
IN2	,0000	,5000	,039
INt	,0000	1,6000	,007
Vuelta4	,0000	,6000	,017
Tin2	,0000	,5450	,039
Tint	,0000	4,1373	,008

La prueba de U de Mann Witney indicó que el efecto de la Yohimbina fue significativamente mayor en el grupo experimental para las conductas de: IN2 ($p = ,039$); INt ($p = ,007$); Vuelta4 ($p = ,017$); Tin2 ($p = ,039$) y por último, Tint ($p = ,008$), (ver figura 10).

La prueba de U de Mann Witney indicó que el grupo control obtuvo resultados significativos para las conductas de: Hdnp5 ($p = ,022$); R2 ($p = ,001$); R5 ($p =$

,002); Rt ($p = ,001$); Tsapnp2 ($p = ,003$); Thdnp1 ($p = ,038$); Thdnp5 ($p = ,022$); Tr5 ($p = ,025$); Trt ($p = ,045$) y por último EBC ($p = ,011$), con respecto al grupo experimental.



Figura 10: Imagen tomada en nuestro laboratorio de *rata grupo experimental realizando conducta de inmovilización en brazo cerrado, durante más de dos minutos.*

Los resultados no arrojaron diferencia significativa alguna para las variables clásicas, corroborando los resultados previamente obtenidos en el laboratorio.

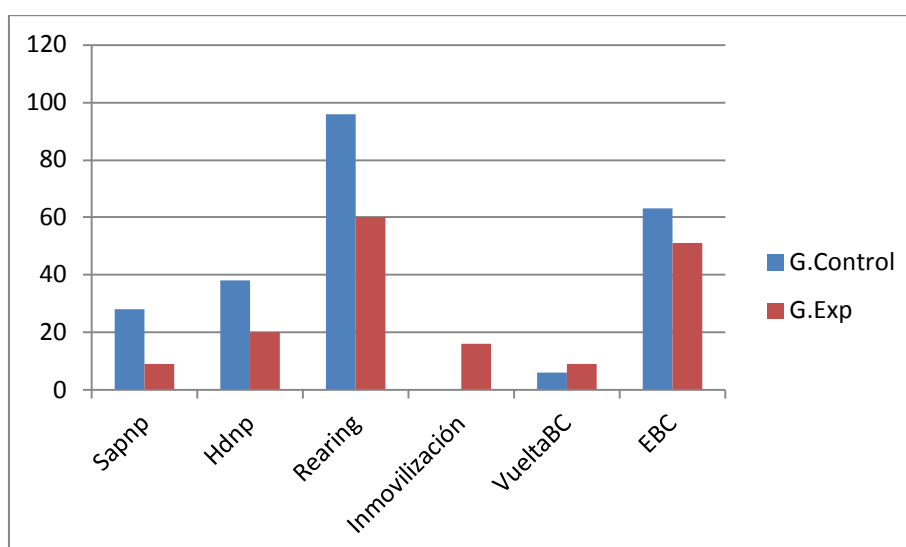
Estos resultados indican que los animales del grupo control (no inyectados con Yohimbina) mostraron más comportamientos de evaluación de riesgos (menos miedo) que los animales del grupo experimental (inyectados con Yohimbina).

4. Discusión

El presente estudio examinó el efecto de una dosis de 2,5 mg/kg de Yohimbina sobre la conducta exploratoria de los animales en el Laberinto Elevado en Cruz (LEC). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la Yohimbina tuvo un efecto ansiogénico detectado a partir de las conductas de Inmovilización, Vuelta al brazo cerrado. Esto significa, que los animales del grupo experimental demostraron un mayor nivel de estrés/ansiedad, ya que las conductas de Inmovilización y Vuelta al brazo cerrado son índices de miedo. Sin embargo, para las conductas de Hdnp, Rearing, Tiempo Sapnp, Tiempo Hdnp, Tiempo Rearing y Entrada a Brazo cerrado, los resultados significativos, pusieron de manifiesto que los animales del grupo control mostraron menor nivel de estrés/ansiedad, ya que esas conductas son índices de tranquilidad.

Respecto a las conductas clásicas, estas no obtuvieron resultados significativos, por lo que se entiende que la dosis utilizada de Yohimbina en este estudio, no reveló efectos significativos sobre estas conductas.

Comparando las medias obtenidas en los dos grupos, también cabe destacar que las conductas de Sapnp (ver figura 11), Hdnp (ver figura 12), Rearing y EBC son realizadas un mayor número de veces por los animales del grupo control que el grupo experimental y dado que estas conductas son índices de tranquilidad mostrada por parte del animal, se concluye que los animales del grupo control realizaron un mayor número de conductas exploratorias que el grupo experimental (ver gráfica 1).



Gráfica 1.

Diferencias grupo control y grupo experimental.



Figura 11: Imagen tomada en nuestro laboratorio de rata grupo control realizando un Sapnp.

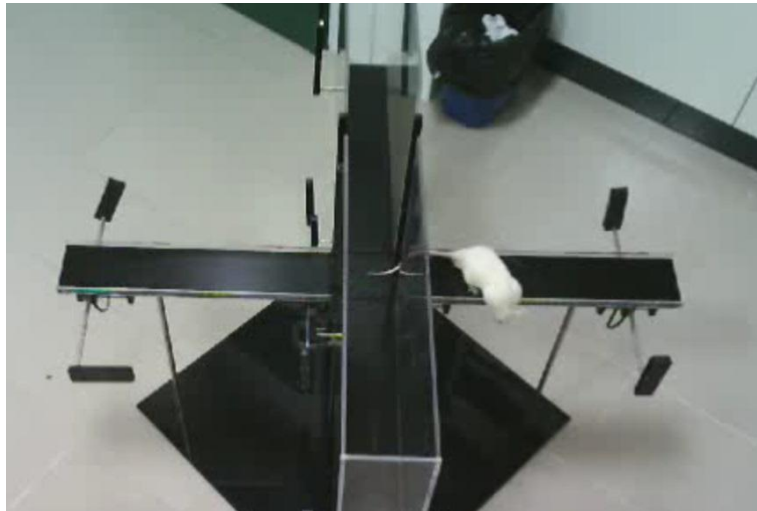


Figura 12: Imagen tomada en nuestro laboratorio de *rata grupo control* realizando un *Hdnp*.

Dado estos resultados, se puede concluir que la dosis de Yohimbina utilizada, mostró efectos significativos en las conductas de Inmovilización y Vuelta al brazo cerrado, las cuales son índices de miedo, por lo que la Yohimbina tuvo un efecto ansiogénico sobre estas conductas en los animales del grupo experimental.

También se obtuvieron resultados significativos en las conductas de evaluación de riesgo de Sapnp, Hdnp, EBC y Rearing que fueron realizadas un mayor número de veces por los animales del grupo control, lo que significa, que hay un mayor número de conductas no ansiogénicas, es decir, menor nivel de estrés/ansiedad, ya que dichas conductas son índices de tranquilidad por parte del animal.

5. Conclusión.

La conclusión principal que se deriva de estos resultados, es que el uso del enfoque etológico para la recopilación de datos puede contribuir a minimizar los falsos negativos (cuando un tratamiento farmacológico no aporta resultados significativos con los parámetros clásicos) y por lo tanto para aumentar la consistencia de los resultados arrojados por la Yohimbina (o cualquier otras drogas) utilizadas en el laberinto elevado en cruz, como ya indicaron, Cárdenas y Navarro, (2002); Suzanne, et al., (2015) y Roy y Chapillon, (2004).

Para líneas futuras de investigación, se recomienda realizar un análisis etológico, además del análisis de los parámetros clásicos, a la vista de los resultados del presente estudio, ya que una reducción de los falsos negativos es una meta que en todo estudio se quiere conseguir, al igual que aumentar la consistencia de los resultados obtenidos.

6. Bibliografía

- Amanda, A., Braun, Matthew, R., Skelton, Charles, V., Vorhees y Michael T., Williams (2010). Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague–Dawley rats: Effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(3), 406-415.
- Amanda, L.J., y Sandra, E.F. (1989). Yohimbine's Anxiogenic Action: Evidence for Noradrenergic and Dopaminergic Sites. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 32(1), 151-156.
- Baldwin, H.A., Johnston, A.L., y File, S.E. (1989). Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. *European journal of pharmacology*, 159(2), 211-215.
- Bremner, J. D., Krystal, J. H., Southwick, S. M., y Charney, D. S. (1996). Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. *Synapse*, 23(1), 28-38.
- Cárdenas, J., y Navarro, J.F. (2002). Modelos animales de ansiedad incondicionada (I). *Biological psychiatry*, 9(1), 18-31.
- Cockerham, W.C. (2001). *Handbook of medical sociology*. Nueva York: Prentice-Hall.
- De la Torre Vacas, M.L. (2011). Estudio de posibles factores determinantes de la relación entre estrés y los efectos motivacionales del etanol: edad, género y exposición previa a la droga.
- Graeff, F. G., Netto, C. F., y Zangrossi Jr, H. (1998). The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(2), 237-246.

- Hogg, S. (1996). A Review of the Validity and Variability of the Elevated Plus-Maze as an Animal Model of Anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1), 21-30.
- Kelly, M.B., Sudie, E.B., Phong, D., y Ronald, E.S. (2010). Yohimbine stress potentiates conditioned cue-induced reinstatement of heroin-seeking in rats. *Behavioural Brain Research*, 208(1), 144-148.
- Kumar, D., Bhat, Z. A., Kumar, V., y Shah, M. Y. (2013). Coumarins from *Angelica archangelica* Linn. and their effects on anxiety-like behavior. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 40, 180-186.
- Roy, V., y Chapillon, P. (2004). Further evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. *Behavioural brain research*, 154(2), 439-448.
- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., y Dourish, C. T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 116(1), 56-64.
- Sipes, T. E., y Geyer, M. A. (1995). DOI disruption of prepulse inhibition of startle in the rat is mediated by 5-HT_{2A} and not by 5-HT_{2C} receptors. *Behavioural pharmacology*.
- Sorregotti, T., Mendes-Gomes, J., Rico, J.L., Rodgers, R.J., y Nunes-de-Souza, R.L. (2013). Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice. *Behavioural brain research*, 246, 76-85.
- Suzanne, M., Peters, H.J., Pothuizen y Berry M., Spruijt (2015). Ethological concepts enhance the translational value of animal models. *European Journal of Pharmacology*, 759, 42-50.
- Swann, A.C., Birnbaum, D., Jagar, A.A., Dougherty, D.M., y Moeller, F.G. (2005). Acute yohimbine increases laboratory-measured impulsivity in normal subjects. *Biological psychiatry*, 57(10), 1209-1211.
- Tjurmina, O. A., Goldstein, D. S., Palkovits, M., y Kopin, I. J. (1999). α 2-Adrenoceptor-mediated restraint of norepinephrine synthesis, release, and turnover during immobilization in rats. *Brain research*, 826(2), 243-252.
- Vijender, K., Zulfiqar, A.B. y Dinesh, K. (2013). Animal models of anxiety: A comprehensive review. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 68(2), 175-183.

- Wada, T., y Fukuda, N. (1991). Effect of a new anxiolytic, DN-2327, on learning and memory in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 41(3), 573-579.
- Yap, J. J., y Miczek, K. A. (2009). Stress and rodent models of drug addiction: role of VTA–accumbens–PFC–amygdala circuit. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 5(4), 259-270.
- Yeung, M., Lu, L., Hughes, A.M., Treit, D., y Dickson, C.T. (2013). FG7142, yohimbine, and β CCE produce anxiogenic-like effects in the elevated plus-maze but do not affect brainstem activated hippocampal theta. *Neuropharmacology*, 75, 47-52.

Anexo 1. Significado de abreviaturas utilizadas en el texto.

- **Sapnp:** *SAP no protegido* (del inglés, stretched attend posture) en la que el animal se estira en toda su longitud y explora olfateando sin moverse del sitio en el brazo abierto.
- **Hdp:** Head-dipping protegido, el animal saca la cabeza por debajo del nivel de los brazos del laberinto en el brazo cerrado o en el centro del laberinto.
- **Hdpnp:** Head-dipping no protegido, el animal saca la cabeza por debajo del nivel de los brazos del laberinto en el brazo abierto.
- **R:** Rearing, el animal se levanta apoyado sobre sus dos patas traseras.
- **EBC:** Entradas a brazos cerrados.
- **IN:** Inmovilización, indica el nivel general de actividad por parte del animal.
- **VUELTA:** el animal mantiene sus dos patas traseras en el brazo cerrado mientras explora el centro del laberinto o un brazo abierto.