



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN PSICOLOGIA  
NEUROCIENCIAS DE LA CONDUCTA

“PARTICIPACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL LÍQUIDO AMNIÓTICO EN LA  
RESPUESTA CONDUCTUAL AL ESTRÉS EN RATAS INFANTILES”

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN PSICOLOGIA

PRESENTA:  
M en C JONATHAN CUETO ESCOBEDO

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Carlos Manuel Contreras Pérez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Yolanda del Rio Portilla - Facultad de Psicología  
Dra. Gloria A. Benítez King - PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN PSICOLOGIA  
Dra. Blandina Bernal Morales - PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN PSICOLOGIA  
Dra. Ana Gloria Gutiérrez García - PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN PSICOLOGIA

MÉXICO, D. F. MARZO DE 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Fue parcialmente auspiciado por un donativo del Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACyT: CB-2006–1, 61741), así como por un donativo DGAPA-PAPIIT IN211111-3 por parte de la UNAM. Durante el desarrollo del presente trabajo Jonathan Cueto Escobedo recibió una beca (CONACyT- Reg. 171055) para estudios de posgrado.

## JURADO EVALUADOR

Dr. Carlos M. Contreras  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM  
e Instituto de Neuroetología,  
Universidad Veracruzana.  
Xalapa, Veracruz, México.

Dra. Irma Yolanda Del Río Portilla  
Facultad de Psicología, Posgrado,  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
Distrito Federal, México.

Dra. Gloria A. Benítez King  
Departamento de Neurofarmacología,  
Instituto Nacional de Psiquiatría.  
Distrito Federal, México.

Dra. Blandina Bernal Morales  
Laboratorio de Neurofarmacología,  
Instituto de Neuroetología,  
Universidad Veracruzana  
Xalapa, Veracruz, México.

Dra. Ana Gloria Gutiérrez García  
Laboratorio de Neurofarmacología,  
Instituto de Neuroetología y  
Facultad de Psicología, Universidad Veracruzana  
Xalapa, Veracruz, México.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al **Doctor Carlos M. Contreras** por la oportunidad de trabajar con él todo este tiempo, por guiar el curso de mi trabajo y por sus consejos como un gran maestro, médico e inigualable amigo, que han influido notablemente en mi formación profesional.

A la **Doctora Irma Yolanda Del Río Portilla** por su disposición, consejos y conocimientos compartidos durante el desarrollo de este proyecto.

A la **Doctora Gloria A. Benítez King** por la confianza depositada y por compartir su valiosa experiencia conmigo para enriquecer este trabajo.

A la **Doctora Blandina Bernal Morales** por el tiempo y esfuerzo dedicado, así como la paciencia y consejos durante mi desarrollo profesional.

A la Doctora **Ana Gloria Gutiérrez García** por compartir todos sus conocimientos y dedicar tiempo a mi formación.

En general al comité tutorial y evaluador.

Al **Doctor Francisco Rodríguez Landa** y al **Maestro Gabriel Guillén Ruiz** por su constante apoyo y valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

Al personal de la Facultad de Psicología y la Coordinación del Posgrado por todas las facilidades y disposición para resolver mis dudas y realizar los trámites necesarios durante el doctorado.

Dedico este trabajo con un inmenso amor y agradecimiento a Alma R. Escobedo,  
mi madre, por abrir ante mí un mundo de ciencia y arte.

Para mi Padre, Andrés Cueto, que nunca se ha rendido.

Con amor para Lizette Cueto.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Sistemas de protección al estrés durante la gestación y el desarrollo posnatal. ....	2
2.2 Líquido amniótico.....	6
2.3 Ácidos grasos .....	7
2.4 Ansiedad y depresión infantil .....	10
2.5 Modelos animales para el estudio de respuestas al estrés .....	12
2.6 Modelo de nado forzado .....	12
2.7 Modelo de nado en la rata prepuberal.....	14
2.8 Modelos de ansiedad en ratas .....	14
2.9 Modelo de enterramiento defensivo .....	15
2.10 Modelo de laberinto de brazos elevados .....	16
2.11 Respuestas al estrés en etapas tempranas con modelos animales .....	17
2.12 Modelo de enterramiento defensivo en etapas tempranas.....	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	20
5. OBJETIVO GENERAL.....	20
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....	21
6. HIPÓTESIS .....	21
7. MATERIAL Y MÉTODOS .....	22
7.1 Ética .....	22
7.2 Animales .....	22
7.3 Pruebas conductuales .....	22
7.3.1 Prueba de enterramiento defensivo .....	22
7.3.2 Prueba de actividad locomotriz en campo abierto .....	25
7.3.3 Prueba de nado forzado .....	26
7.3.4 Prueba de luz-oscuridad .....	28
7.3.5 Modelo de laberinto de brazos elevados.....	28
8. EXPERIMENTO 1: Comparación de la conducta de enterramiento en la arena circular (283 cm <sup>2</sup> ) y la arena cuadrada (579.15 cm <sup>2</sup> ) .....	31
8.1 Objetivo .....	31

8.2 Grupos experimentales .....	31
8.3 Diagrama de trabajo.....	32
8.4 Análisis estadístico .....	32
8.5 Resultados.....	32
8.5.1 Latencia al enterramiento.....	32
8.5.2 Duración del enterramiento.....	33
9. EXPERIMENTO 2: Control farmacológico con diazepam en la prueba de enterramiento defensivo variando el tamaño y la forma de la arena de enterramiento. ....	35
9.1 Objetivo .....	35
9.2 Grupos experimentales. ....	35
9.3 Diagrama de trabajo.....	37
9.4 Análisis estadístico .....	37
9.5 Resultados.....	38
9.5.1 Prueba de enterramiento defensivo .....	38
9.5.1.1 Latencia al enterramiento.....	38
9.5.1.2 Duración del enterramiento.....	39
9.5.1.3 Tiempo de acalamiento.....	41
9.5.1.4 Tiempo de exploración vertical .....	42
9.5.1.5 Tiempo de Inmovilidad .....	43
9.5.1.6 Tiempo de actividad inespecífica .....	44
9.5.1.7 Resumen de los resultados de enterramiento .....	45
9.5.2 Prueba de actividad locomotriz.....	46
9.5.2.1 Locomoción .....	46
9.5.2.2 Distancia recorrida.....	46
9.5.2.3 Exploración vertical.....	46
10. EXPERIMENTO 3: efecto de la administración de ácidos grasos en las pruebas de nado forzado, enterramiento defensivo y luz-oscuridad. ....	48
10.1 Objetivo .....	48
10.2 Grupos experimentales .....	48
10.3 Solución de vehículo.....	48
10.4 Solución de ácidos grasos .....	49
10.5 Diagrama de trabajo.....	49



10.6 Análisis estadístico .....	50
10.7 Resultados.....	50
10.7.1 Prueba de nado forzado.....	50
10.7.1.1 Distancia.....	50
10.7.1.2. Tiempo de inmovilidad.....	52
10.7.1.3 Número de inmovilidades .....	53
10.7.1.4 Número de cruces.....	55
10.7.2 Prueba de actividad locomotriz.....	56
10.7.3 Prueba de enterramiento defensivo.....	57
10.7.3.1 Latencia al enterramiento .....	57
10.7.3.2 Duración del enterramiento.....	57
10.7.4 Prueba de luz/oscuridad .....	58
11. EXPERIMENTO 4: efecto de la administración de ácidos grasos en el modelo de laberinto de brazos elevados. ....	59
11.1 Objetivo .....	59
11.2 Grupos experimentales .....	59
11.3 Solución de vehículo.....	59
11.4 Solución de ácidos grasos .....	59
11.5 Diagrama de trabajo.....	60
11.6 Análisis estadístico. ....	60
11.7 Resultados .....	61
11.7.1 Laberinto de brazos elevados.....	61
11.7.2 Conductas de evaluación del riesgo .....	62
11.7.3 Prueba de actividad locomotriz.....	63
12. Discusión.....	64
12.1 Modelo Teórico .....	74
13. CONCLUSIONES.....	75
14. REFERENCIAS .....	76

## APÉNDICE I.

Contreras, C.M., Rodríguez-Landa, J.F., Gutiérrez-García, A.G., Mendoza-López, M.R., García-Ríos, R.I. & Cueto-Escobedo J. (2011). Anxiolytic-like effects of human

amniotic fluid and its fatty acids in Wistar rats. *Behavioural Pharmacology*, 22 (7), 655-662.

#### APÉNDICE II

Cueto-Escobedo, J., Contreras, C.M., Bernal-Morales, B., Guillén-Ruiz, G. & Rodríguez-Landa, J.F. (2013). Defensive burying test in postweaning rats: utility of a small round chamber. *Behavioural Pharmacology*, 24:693–698.

#### APÉNDICE III

Rodríguez-Landa, J.F., García-Ríos, R.I., Cueto-Escobedo, J. Bernal-Morales, B. & Contreras, C.M. (2013) Participation of GABAA chloride channels in the anxiolytic like effects of a fatty acid mixture. *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 121794, 7 pages, doi:10.1155/2013/121794

#### APÉNDICE IV

Contreras C.M., Cueto-Escobedo, J., Bernal-Morales, B, Guillén-Ruiz, G. & Rodríguez-Landa, J.F. Fatty acids from human amniotic fluid reduce anxiety-like behaviors of infantile rats (*Behavioural pharmacology* 2014. en arbitraje)

## RESUMEN

El líquido amniótico ofrece protección mecánica y bioquímica al feto en desarrollo. Además, participa en la emisión de respuestas apetitivas, de reconocimiento y de establecimiento de vínculos afectivos entre la madre y las crías de diferentes mamíferos, incluidos los seres humanos. Un trabajo previo de nuestro grupo demostró que los ácidos grasos presentes en el líquido amniótico humano producen un efecto tipo ansiolítico en ratas adultas. El propósito general de esta investigación fue estudiar las acciones conductuales de los ácidos grasos en ratas infantiles de 28 días de edad postnatal (PN) en las cuales la influencia del cuidado materno es más reciente. El primer objetivo fue desarrollar un dispositivo que midió la ansiedad experimental a los 28 PN ya que a esta edad las ratas infantiles no entierran el electrodo en el modelo de enterramiento defensivo usado en adultos, por lo tanto se estudió si una arena circular de enterramiento permite medir ansiedad en ratas de 28 PN en comparación con el modelo original. El segundo objetivo fue la validación farmacológica del modelo circular utilizando diazepam. El tercer objetivo fue explorar el efecto de los ácidos grasos en una batería conductual de pruebas de depresión y ansiedad experimental (nado forzado, enterramiento defensivo, caja de luz/oscuridad) y compararlo con el efecto del diazepam. El cuarto objetivo fue confirmar el efecto ansiolítico de los ácidos en el modelo de laberinto de brazos elevados en cruz utilizando ratas de 28 PN. La prueba de actividad locomotriz en campo abierto se utilizó para descartar cualquier efecto motor de los tratamientos. Resultados: el experimento uno y dos demostró que las modificaciones en el tamaño y forma de la caja de enterramiento defensivo aumentan las conductas sugerentes de ansiedad en ratas de 28 días. En general, un menor tamaño y la falta de esquinas inducen un mayor estrés que aumentó el enterramiento de las ratas infantiles. Los ácidos grasos disminuyeron el enterramiento en la arena circular ( $p < 0.05$ ) de manera semejante al diazepam, sin tener efecto en la prueba de nado forzado y de luz oscuridad y sin modificar la actividad locomotriz. Los ácidos grasos aumentaron el tiempo de permanencia y el número de entradas al brazo abierto ( $p < 0.05$ ), las conductas de evaluación de riesgo también fueron modificadas por los ácidos grasos de manera consistente con un efecto ansiolítico. Conclusión: Los ácidos grasos producen efectos ansiolíticos semejantes a los producidos por el diazepam en ratas infantiles evaluadas en dos diferentes modelos experimentales de ansiedad, lo que sugiere que los ácidos grasos contenidos en los fluidos maternos pueden constituir un factor de protección contra el estrés en etapas tempranas de la vida.

## **ABSTRACT**

Amniotic fluid exerts mechanical and biochemical protection to fetus during development. Additionally, it plays a role in appetitive and recognition responses that form an emotional link between offspring and the mother in several mammals including human beings. Previous work from our research group showed that fatty acids from human amniotic fluid produce anxiolytic effects in adult Wistar rats. The main goal of the present research was to study the behavioral effects of fatty acids in infantile rats of 28 postnatal days old (PN) in which maternal care influence is recent. In order to do this, the first objective was to develop an effective device for measuring behavioral indicators of experimental anxiety in 28 PN rats since infantile rats does not display burying behavior in the device used in adult rats. The second objective was to validate the circular device of burying using diazepam as a positive control. The third objective was to explore the effects of fatty acids and comparing them to diazepam using a battery of behavioral tests (the forced swim test, the defensive burying test, the light/dark box). Fourth objective was to replicate the anxiolytic effect of fatty acids in 28 PN rats using the elevated plus maze. Activity test in the open field box was used to discard any motor effect due to treatments. Results: experiment one and two showed that changes in shape and size of defensive burying device increased anxiety-like behaviors in 28 PN rats. Fatty acids from amniotic fluid decreased burying ( $p < 0.05$ ) in the circular device in a similar way to diazepam but lacked of effect in forced swim test and light/dark box. Fatty acids also increased the time the rats explored the open arms of elevated plus maze ( $p < 0.05$ ), risk assessments behaviors were also modified by fatty acids in a typical anxiolytic pattern and without modifying motor activity. Conclusion: fatty acids produce anxiolytic effects similar to diazepam when administered to infantile rats in two different models of experimental anxiety. It suggests that fatty acids from amniotic fluid would act as a protection factor against stress in early life.

## 1. INTRODUCCIÓN

El líquido amniótico se produce por la placenta al inicio de la gestación, y posteriormente también por la acción de filtración de los riñones y pulmones del feto (Beall et al., 2007). Este líquido proporciona una protección mecánica, térmica y es un medio adecuado y estable para el desarrollo del feto (Schmidt, 1992; Kanayama, 1994), además, sus componentes y su interacción funcional con la placenta le permiten ser un protector bioquímico. Por ejemplo, la enzima 11 $\beta$ -hidroxi-esteroide deshidrogenasa actúa como una barrera placentaria que previene, al menos en roedores y en el ser humano, que el cortisol materno que normalmente se libera en situaciones de estrés maternal, se filtre hacia el líquido amniótico y afecte el desarrollo del feto (Yang, 1997). Pero además, es posible que alguno de los componentes del líquido amniótico ejerza cierta función de impronta intrauterina que permita el reconocimiento de la díada madre-hijo después del parto (Shapiro y Salas, 1970; Marlier et al., 1997). La formación de este vínculo entre los neonatos y sus cuidadores es de suma importancia pues permite la regulación de las respuestas al estrés de la descendencia (Meaney, 2001).

El término estrés comprende un cambio fisiológico o psicológico que altera la homeostasis en respuesta a un estímulo amenazador para el individuo. El eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal regula las respuestas hormonales al estrés que culminan con la secreción de los glucocorticoides encargados de la activación vegetativa que prepara al individuo para afrontar la situación de amenaza (Herman et al., 2003). Sin embargo, la activación prolongada de este eje produce efectos nocivos (Selye, 1936; Selye, 1955; Charmandari et al., 2003). En este sentido, la población infantil y adolescente enfrenta obstáculos estresantes acordes a su nivel de desarrollo, como la falta de comprensión de los fenómenos naturales y sociales en su medio (Seligman, 1992), las presiones sociales, las exigencias escolares (Fröjd et al., 2008; Hjern et al., 2008) o las dinámicas sociales (La Greca y Harrison, 2005; McElhaney et al., 2008) que junto con el maltrato y la negligencia infantil aumentan la vulnerabilidad a padecer ansiedad y depresión desde etapas

tempranas del desarrollo hasta la vida adulta (Gunnar et al., 2006; Heim et al., 2008). Sin embargo, la mayor parte de las funciones del líquido amniótico no han sido totalmente exploradas y desde un punto de vista evolutivo resulta de interés su estudio, dado que el líquido amniótico participa en los procesos de selección natural debido a sus posibles propiedades protectoras del individuo en fase embrionaria y fetal, lo cual tampoco ha sido abordado desde un punto de vista experimental. Por lo tanto, el presente trabajo estudia la posible participación de los ácidos grasos que componen el líquido amniótico en la regulación de las respuestas al estrés en etapas infantiles con el uso de modelos animales.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Sistemas de protección al estrés durante la gestación y el desarrollo posnatal.**

Durante la gestación es posible detectar algunos procesos encaminados a aminorar los efectos deletéreos del estrés y así favorecer la supervivencia del individuo y de la especie. Las adaptaciones fisiológicas que ocurren durante el embarazo, por ejemplo, la disminución en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal de la madre tiende a evitar que las hormonas del estrés secretadas por ella produzcan efectos nocivos sobre el feto (Albers et al., 2008; Brunton et al., 2008). Por otro lado, alrededor del día 14 de gestación de la rata Wistar, ocurre un incremento de la tasa de disparo neuronal del núcleo septal lateral (una estructura relacionada con el placer) en paralelo al incremento máximo en las concentraciones plasmáticas de progesterona durante la gestación, lo que en conjunto se relaciona con cambios en las estrategias de afrontamiento que llevan a una disminución de las manifestaciones de la desesperanza (Contreras et al., 2008). Estas acciones parecen proteger a la madre y sus crías durante la gestación, ya que notablemente estos cambios conductuales y neuronales son

comparables a los que producen los fármacos antidepresivos clínicamente eficaces (Contreras et al., 2001; Dhir, 2008).

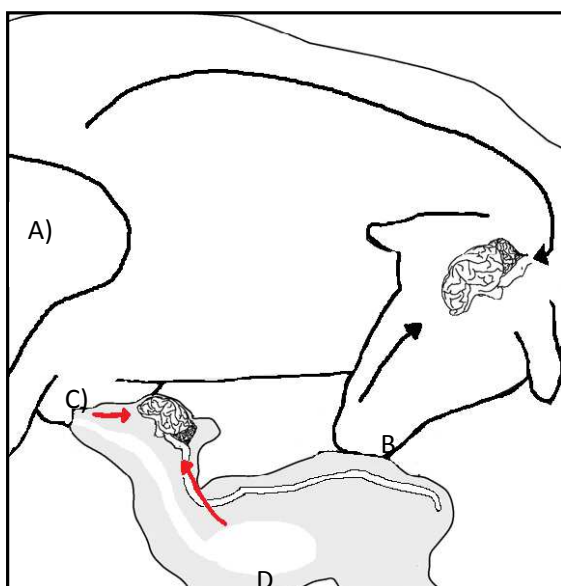
En todas las especies que dependen del cuidado parental para su supervivencia existen mecanismos que aseguran la formación de un fuerte vínculo entre los padres y su descendencia. Un ejemplo claro de estos mecanismos es el fenómeno de impronta estudiado por Konrad Lorenz. Este investigador austriaco observó es que al nacer, las crías de ganso gris silvestre “aprenden” de alguna manera a reconocer como su madre al primer ser vivo (o incluso un objeto inanimado) con el que interactúan y del que después nunca se separarán hasta la edad adulta, y si por accidente lo hacen, dedican todas sus energías a tratar de encontrarlo. Por lo tanto llamó impronta ("imprinting") a la huella que queda en el cerebro de los ánaes recién nacidos con la imagen de su madre o del primer ser que encuentra al salir del cascarón, lo cual es relevante porque para los recién nacidos el permanecer cerca de su madre es una cuestión de vida o muerte (Lorenz, 1962). Por lo tanto, el fenómeno de impronta puede considerarse como un mecanismo de adaptación de la crías, pues les permite el establecimiento de un vínculo afectivo con la madre lo cual aumenta sus probabilidades de supervivencia.

Respecto a los seres humanos, en 1877 Charles Darwin observó en el humano un tipo de reconocimiento semejante al de otros mamíferos al estudiar el desarrollo conductual de sus propios hijos y observó lo siguiente: *“A la edad de 32 días percibe el pecho de su madre cuando se encuentra a 32 pulgadas de él, lo cual se hace manifiesto por la protrusión de sus labios y sus ojos fijos, pero dudo mucho que esto tenga alguna conexión con la visión; lo cierto es que él no había tocado el pecho. Si se ha guiado a través del sentido del olfato o la sensación de calidez o por medio de una asociación hecha con la posición en la que es cargado siempre que se le alimenta es algo que no puedo concluir con seguridad”* (Darwin, 1877). Aunque él mismo admite que sus observaciones no son concluyentes,

señaló la importancia del olor de la madre para el reconocimiento y establecimiento entre ella y sus neonatos. Además, resulta sorprendente la posibilidad de que estos factores de protección del individuo y de la especie puedan ocurrir desde antes del nacimiento, sin embargo, el mecanismo es diferente e implica la estimulación sensorial durante la gestación para el posterior reconocimiento de la díada madre-hijo. Por ejemplo, en las ovejas, los fluidos del parto atraen a la madre para interactuar con la cría y el acicalamiento lleva a la orientación de la cría hacia el pezón materno (Nowak y Poindron, 2006); en el humano, los bebés aprenden a reconocer la voz y el olor de la madre desde la vida intrauterina (Sullivan, 2003).

En la rata este reconocimiento olfativo ocurre durante un periodo crítico que abarca desde el nacimiento hasta el día 10 postnatal (PN) y coincide con un aumento en la actividad neuronal del *locus coeruleus*, lo que al parecer se relaciona con el rápido aprendizaje olfativo y el establecimiento de la preferencia hacia el olor de la madre durante esta etapa, además se detecta una amígdala cuyo patrón de actividad es hipofuncional, lo que previene el aprendizaje aversivo hacia la madre (Moriceu y Sullivan, 2004). Estos hallazgos sugieren que el cerebro del neonato no es una versión inmadura del cerebro adulto, sino más bien, un órgano diseñado para optimizar el vínculo madre-hijo (Moriceu y Sullivan, 2005). Así, el olor y el sabor del líquido amniótico, el calostro y la leche materna forman una huella de reconocimiento que facilita la transición de la vida intrauterina al ambiente sensorial extrauterino (Shaal et al., 1991, 1995; Marlier et al., 1998; Marlier y Schaal, 2005; Henderson et al., 2007, Nowak et al., 2007) ver figura 1.





A) La labor de parto eleva la liberación de oxitocina, GABA y noradrenalina que participan en el reconocimiento y preferencia de la cría.

B) El olor y sabor del líquido amniótico establecen el reconocimiento olfativo de la cría.

C) El reconocimiento olfativo y la acción de amamantamiento de la cría junto con D) la distensión del estómago por la acción mecánica del calostro y sus compuestos químicos participan en la formación del vínculo posiblemente por estimulación del nervio vago y el sistema a opioides.

**Figura 1. Mecanismos cerebrales involucrados en el desarrollo del vínculo madre-cría en la oveja** (Modificado de Nowak et al., 2007).

El líquido amniótico forma un ambiente con el que organismo en desarrollo está en contacto, algunos estudios sugieren que este ambiente posee pistas sensoriales que parecen quedar grabadas de alguna manera durante la vida intrauterina ya que el recién nacido es capaz de orientar la cabeza hacia el olor de su propio líquido amniótico o de la leche materna (Shaal et al., 1991; Marlier et al., 1998, Marlier y Schaal, 2005; Guiraudie-Capraz et al., 2005; Henderson et al., 2007). Además, en humanos recién nacidos la estimulación odorífera con líquido amniótico materno (Shaal y Marlier, 1998) o leche materna (Nishitani et al., 2009) produce calma en ausencia de la madre, una observación que se ha reproducido experimentalmente en la rata y en otros mamíferos, incluyendo al ser humano (Lévy et al., 1983; Marlier et al., 1998; Nowak et al., 2000; Schaal et al., 1994; Schapiro y Salas, 1970; Varendi et al., 1998, Sullivan y Toubas, 1998). También se ha observado que la ingestión de líquido amniótico, aunque carece de efectos *per se*, modula de manera positiva la respuesta del sistema opioide ante administraciones de morfina en especies como la rata (Kristal, 1991; Corpening et al., 2000; Neumann et al., 2009) y el ganado vacuno (Pinheiro Machado et al., 1997). A pesar de su amplia actividad biológica, sólo existe un reporte que ha explorado el efecto ansiolítico del líquido amniótico, en el cual la administración

subcutánea de 1 ml de líquido amniótico humano produce un efecto tipo ansiolítico en la rata Wistar adulta sometida a la prueba de enterramiento defensivo, este efecto consiste en una disminución del tiempo de enterramiento (Contreras et al., 2011; ver apéndice I).

## **2.2 Líquido amniótico**

El líquido amniótico está formado por varias sustancias como hormonas, ácidos grasos y enzimas, que en su mayoría son resultado del intercambio de sustancias del producto con la madre gestante (Codaccioni et al., 1995). Notablemente, se ha propuesto que los componentes de estos fluidos biológicos pueden actuar como una señal química olfatoria que asegura el reconocimiento de la cría hacia su madre (Marlier et al., 1997) lo que indica su importancia para la supervivencia del individuo durante el desarrollo. En trabajos previos de nuestro grupo se encontró que el líquido amniótico contiene hormonas con probados efectos ansiolíticos: estradiol ( $828.4 \pm 220.22$  pg/ml), progesterona ( $76.6 \pm 28.5$  ng/ml) (Contreras et al., 2011), testosterona ( $1.25 \pm 0.33$  ng/ml) y cortisol ( $6.2 \pm 1.61$  µg/ml) (datos no publicados), pero estas concentraciones están por debajo de las requeridas para producir efectos ansiolíticos en la rata, en donde son necesarios de 0.10 a 4.0 µg/rata de estradiol (Koss et al., 2004; Lund et al., 2005; Walf y Frye, 2005) ó 1mg/rata de progesterona (Fernández-Guasti et al., 1999; Martínez-Mota et al., 2000). De la misma manera, los efectos ansiolíticos de la testosterona (Bing et al., 1998; Bitran et al., 1993) y el estradiol se observan con concentraciones mucho mayores que las encontradas en el líquido amniótico. Además, el líquido amniótico contiene ácidos grasos de entre los cuales los más abundantes (por arriba de 600 µg/ml) son el ácido palmítico (752.59 µg/ml), el oleico (639.06 µg/ml) y el linoleico (766.41 µg/ml), es decir que en promedio estos tres ácidos están presentes en una concentración de aproximadamente  $719.35 \pm 40.34$  µg/ml. Otros ácidos grasos que se encuentran en concentraciones menores en el líquido amniótico son el láurico, esteárico y mirístico (Contreras et al., 2011). Notablemente, los ácidos grasos abundantes, oleico, linoleico y palmítico; junto con los ácidos láurico, esteárico y mirístico; que se encuentran en menor cantidad

en el líquido amniótico, también están presentes en concentraciones relativas semejantes en la leche materna y en el calostro (Mendoza López et al., 2010) en donde parecen conformar una señal química de transición entre la vida intrauterina y postnatal (Contreras et al., 2013).

## 2.3 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son cadenas de hidrocarburos con un grupo carboxílico terminal (R-COOH). Estos ácidos pueden tener ligaduras sencillas entre sus átomos de carbono (saturados) o ligaduras dobles únicas (insaturados) o múltiples (poliinsaturados). Los ácidos grasos son sintetizados y degradados en unidades de dos carbonos, por lo cual los ácidos grasos más comunes en la naturaleza tienen un número par de carbonos. Debido a que no es posible sintetizar a los ácidos grasos poliinsaturados y que se les requiere para el buen funcionamiento del organismo (ver tabla 1), se les considera elementos esenciales para la dieta (García-Sáinz, 2005).

**Tabla 1. Ácidos grasos de importancia para el ser humano.**

Símbolo numérico*	Estructura	Nombre común
16:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -COOH	Palmítico
16:1(9)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	Palmitoleico
18:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -COOH	Estearico
18:1(9)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	Oleico
18:2 (9,12)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> -CH=CH) <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	Linoleico
18:3(9,12,15)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> -CH=CH) <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	Linolénico
20:4(5,8,11,14)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> -CH=CH) <sub>4</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COOH	Araquidónico

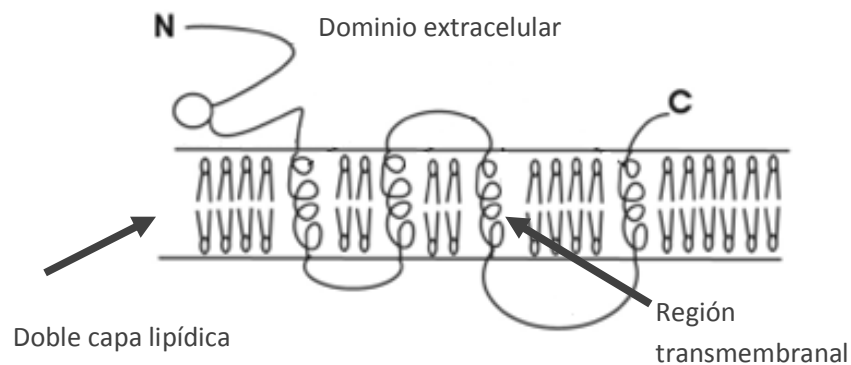
\* Representa de izquierda a derecha el número de átomos de carbono seguido por dos puntos y el número de dobles enlaces. Entre paréntesis la posición de los dobles enlaces se designan por el número del átomo de carbono donde estos empiezan contando a partir del extremo carboxilo del ácido. Tomado de García-Sáinz, 2005.

Además de la función nutricional, los ácidos grasos también cumplen con otras funciones importantes. Por ejemplo, el ácido araquidónico, de 20 átomos de carbono y 4 dobles ligaduras (poliinsaturado, C<sub>20</sub>, Δ<sup>5,8,11,14</sup>), es el precursor para la síntesis de los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), los cuales regulan la función del músculo liso vascular, gastrointestinal, genitourinario

y respiratorio; además, participan en las funciones de las plaquetas y en la reacción de fiebre, inflamación y dolor en respuesta a diversas agresiones al organismo (García-Sáinz, 2005).

En las células los ácidos grasos se encuentran ligados covalentemente a otras moléculas para formar los fosfolípidos que conforman la mayor parte de la doble capa lipídica de la célula; estos ácidos grasos pueden ser liberados por lipasas intracelulares produciendo ácidos grasos libres (no esterificados). Por lo tanto las sustancias que activan la fosfolipasa liberan los ácidos grasos de la membrana, de proteínas como la albúmina y de lipoproteínas para que actúen de manera indirecta a través de los productos de su oxidación o de manera directa debido a sus acciones sobre los canales iónicos, en la sinapsis o en otros componentes de la membrana celular (Ordway et al., 1991).

Particularmente, los ácidos grasos insaturados, como el palmítico, y los monoinsaturados, como el oleico y linoleico, son constituyentes de los fosfolípidos y esfingolípidos involucrados en la síntesis de membranas celulares y en el mantenimiento de la fluidez de la doble capa lipídica de la membrana de todas las células (Spector, 1999), en especial las del sistema nervioso (Svennerholm, 1968; Svennerholm y Vanier, 1978) y modulan la actividad enzimática, la unión de ligandos con sus receptores, las interacciones celulares y los transportes de nutrientes e iones que participan en los procesos de excitabilidad neuronal, como el  $\text{Na}^+$  (Park y Ahmed, 1992) y el  $\text{Ca}^{+2}$  (El-Yassimi et al., 2008). Además los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga, como el ácido linoleico, modulan la función de sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico (implicado en la regulación emocional) al modificar las propiedades de los receptores y transportadores de membrana (du Bois et al., 2006) y el dopaminérgico (Heller et al., 2005). Los ácidos grasos pueden actuar directamente sobre el canal iónico o sobre una proteína accesoria del canal o bien al modificar las propiedades de la doble capa lipídica donde se encuentra el canal iónico (ver figura 2).



**Figura 2. Topografía del receptor GABA<sub>A</sub>.** El receptor GABA<sub>A</sub> se encuentra parcialmente incrustado en la doble capa lipídica cuyas propiedades de fluidez pueden ser modificadas por la composición de ácidos grasos presentes y así modular la actividad de los canales iónico de acuerdo con lo propuesto por Ordway, 1991 (Modificado de Uusi-Oukari y Korpi, 2010).

Algunos estudios bioquímicos han demostrado que los ácidos grasos actúan directamente sobre varias enzimas lo cual provee un precedente para considerar la posibilidad de acciones similares sobre los canales iónicos. De manera semejante, la albúmina, una proteína soluble en agua, se une a varios ácidos grasos en un rango de concentraciones micromolares por lo que es posible que en las proteínas del canal iónico existan sitios de unión para los ácidos grasos análogos a los de la albúmina (Ordway et al., 1991). En general los efectos fisiológicos de los ácidos grasos sobre células excitables consisten en antagonizar la excitación eléctrica al activar los canales de K<sup>+</sup> e inhibir los canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> lo que tiende a disminuir la amplitud y/o duración de los potenciales de acción o a hiperpolarizar la membrana (Ordway et al., 1991).

Existen ejemplos claros acerca de la función de los ácidos grasos a nivel de sistema nervioso central, por ejemplo: a) el metabolismo de ácidos grasos en el hipotálamo funciona como un indicador biológico de la disponibilidad de nutrientes en el organismo (Jo et al., 2009); por lo tanto los ácidos grasos de cadena pesada,

incluyendo el ácido oleico, actúan en el hipotálamo como una señal de abundancia de nutrientes (Lam et al., 2005; López et al., 2005), en concordancia, la administración de ácidos grasos en el hipotálamo reduce la expresión del neuropéptido-Y e inhibe la ingesta de alimentos y la producción de glucosa endógena en la rata (Obici et al. 2002; Morgan et al. 2004), b) La potenciación a largo plazo, es un proceso que forma las bases sinápticas del almacenamiento de información en el cerebro de mamíferos en el cual se ha involucrado la participación del ácido araquidónico que actúa como un mensajero post sináptico (Williams et al., 1989; Miller et al., 1992), c) el ácido láurico, oleico, linoleico y mirístico se unen a los receptores alfa1-adrenérgicos y muscarínicos en el cerebro de ratas adultas de la cepa Sprague-Dawley; y por último, d) la administración intraperitoneal de sales sódicas de los ácidos grasos cáprico, láurico, mirístico, palmítico y esteárico ejercen un efecto protector contra las convulsiones clónicas producidas con picrotoxina y en menor grado contra las producidas por el pentilentetrazol (Nakamura et al., 1990). La picrotoxina y el pentilentetrazol son antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub>, por lo que el efecto anticonvulsivante de los ácidos grasos mencionados indica que pueden actuar modulando la actividad de este receptor. El receptor GABA<sub>A</sub> está implicado en las acciones ansiolíticas de fármacos clínicamente eficaces como el diazepam. Es posible entonces que los ácidos grasos presentes en el líquido amniótico (palmítico, oleico, linoleico, láurico, esteárico y mirístico), puedan participar en los efectos conductuales evaluados en modelos animales de ansiedad y depresión.

## **2.4 Ansiedad y depresión infantil**

De acuerdo al DSM-IV la ansiedad es un trastorno caracterizado por preocupaciones persistentes e irracionales que desencadenan síntomas somáticos de tensión y activación simpática y deterioran la calidad de vida del paciente aún en ausencia de un peligro eminente (American Psychiatric Association, 2000). Por otro lado, la depresión es un trastorno del estado de ánimo que en los adultos se caracteriza por la presencia de anhedonia, falta de

motivación e ideación suicida entre otros signos y síntomas (American Psychiatric Association, 2000).

La sintomatología de ambos trastornos cambia a lo largo del desarrollo. Antes del año y medio de edad la ansiedad se expresa principalmente como ansiedad de separación, trastornos del sueño y ataques nocturnos de pánico. De los tres a los 5 años se desarrollan ataques de pánico y fobias específicas. Después de los 5 años puede observarse la presencia de síntomas característicos del trastorno de ansiedad generalizada, ansiedad social, desorden obsesivo compulsivo, desorden de estrés postraumático (Beesdo et al., 2009; Abbo et al., 2013). A partir de la segunda década de vida el desorden de pánico, el desorden de ansiedad generalizada y el trastorno de depresión mayor son más comunes (Kessler et al., 2012). Aun así el trastorno depresivo también puede diagnosticarse desde etapas tempranas (3-6 años de edad), aunque las manifestaciones específicas de algunos síntomas depresivos pueden variar con el desarrollo, Por ejemplo, la ausencia de placer (anhedonia), vitalidad, la constante necesidad de aprobación causan un conflicto psíquico que se expresa por medio de conductas agresivas en la etapa preescolar (Pearce, 1978; Pine et al., 1998; Levi et al., 2001). La anhedonia se expresará en los niños mayores como una falta de interés para jugar con juguetes, en adolescentes como una profunda sensación de aburrimiento y en adultos como desinterés en actividades sexuales. De acuerdo con las teorías del desarrollo, los niños no son capaces de experimentar ciertos tipos de síntomas depresivos, lo cual indica que existen diferencias debidas al desarrollo en los síntomas que caracterizan la depresión a distintas edades (Weiss y Garber, 2003; Malhotra y Pratim, 2007).

Los trastornos de ansiedad y de depresión son considerados por algunos investigadores como *continuum* dentro de la psicopatología del individuo, es decir un solo trastorno que evoluciona con diferentes fases a lo largo de su desarrollo (Baldwin et al., 2002; Merikangas et al., 2003; Mergl et al., 2007) mientras otras teorías sugieren que la ansiedad y la depresión son dos trastornos separados pero

que se presentan frecuentemente con una alta comorbilidad (Moffitt et al., 2007; Kessler et al., 2008). Independientemente de si la depresión o la ansiedad se consideran dos o un solo trastorno, ambos tienen como factor común la exposición a circunstancias estresantes, que es un factor que ha sido utilizado para desarrollar modelos animales que permitan el estudio experimental de la ansiedad y la depresión y la acción de fármacos con posibles propiedades ansiolíticas y/o antidepressivas. Estos modelos tienen en común la exposición de los animales de prueba a eventos estresantes.

### **2.5 Modelos animales para el estudio de respuestas al estrés**

Los modelos animales son una herramienta para estudiar los factores ambientales que inciden en el estado de ánimo, así como también las bases neurobiológicas de los trastornos como la ansiedad y depresión con un mayor control de las variables y en sistemas más simples que en el humano. Los modelos deben cumplir con criterios específicos que los hacen válidos para el estudio de patologías humanas, en resumen: a) semejanza en la etiología, es decir que los estímulos que desencadenan la alteración conductual o fisiológica a estudiar sean semejantes a los que producen la alteración en el humano; b) semejanza en la sintomatología, se refiere a que la alteración producida en el animal de experimentación semeje una o varias características de la enfermedad humana que se pretende modelar; y c) semejanza en los efectos del tratamiento eficaz en humanos (McKinney y Bunney, 1969).

### **2.6 Modelo de nado forzado**

La prueba de nado forzado, es un modelo experimental de desesperanza en el que la rata enfrenta una situación estresante al ser sometida a nadar en un estanque lleno de agua del cual no puede escapar. Durante la prueba se mide la duración y frecuencia de la inmovilidad que la rata desarrolla después de un periodo de nado vigoroso así como la latencia a la primera inmovilidad la cual es un indicador de la magnitud del esfuerzo inicial para resolver la situación adversa. La inmovilidad en el nado forzado es un indicador de desesperanza conductual



que semeja la falta de motivación en los seres humanos con depresión y que puede ser revertida con el tratamiento farmacológico clínicamente eficaz en seres humanos (Porsolt et al., 1977; Nestler et al., 2002). Además, la inmovilidad es sensible al efecto de otras manipulaciones estresantes como la restricción de espacio dos horas diarias durante 7 días que aumenta el tiempo de inmovilidad en la sesión de prueba de nado forzado en ratas adultas (Cancela et al., 1991).

El tiempo de inmovilidad en la rata se desarrolla de manera sexualmente dimórfica en donde los machos tienen más inmovilidad que en las hembras (Alonso et al., 1991; Contreras et al., 1995). Este dimorfismo es dependiente de los niveles de hormonas gonadales, las latencias al primer periodo de inmovilidad más largas ocurren durante las fases proestro-estro del ciclo estral de las ratas hembra (Contreras et al., 2000) cuando existen concentraciones plasmáticas y cerebrales elevadas de progesterona, alopregnanolona, pregnanolona y estradiol (Feder, 1981; Freeman, 1988; Frye et al., 2000). Además, la progesterona (i.p.) (Martínez-Mota et al., 1999) y su metabolito, la alopregnanolona (Rodríguez-Landa et al., 2007) reducen el tiempo total de inmovilidad de manera dosis-dependiente en ratas ovariectomizadas, es decir, producen un efecto tipo antidepresivo, similar al observado cuando la progesterona es administrada directamente en el núcleo septal lateral (Estrada-Camarena et al., 2002); por otro lado, la orquidectomía en ratones adultos aumenta el tiempo de inmovilidad en las pruebas de nado forzado y de suspensión del rabo, mientras que la administración de testosterona revierte este efecto (Bernardi et al., 1989), aunque es un resultado debatido puesto que no se replica en ratas (Martínez-Mota y Fernández-Guasti, 2004). Sin embargo, en comparación con la cantidad de estudios en la etapa adulta, son pocos los trabajos que estudian la desesperanza en etapas infantiles de la rata.

## **2.7 Modelo de nado en la rata prepuberal**

Los estudios que evalúan la desesperanza en ratas antes de la pubertad son escasos. En las cepas Flinders sensitive line ó FSL (hipersensibles a agonistas colinérgicos) y Wistar-Kyoto ó WK (hipertensas) que han sido obtenidas del apareamiento de individuos seleccionados, se reportó la presencia de notables indicadores de desesperanza en el nado forzado en la edad adulta, por lo que se ha propuesto a ambas cepas, FSL (Overstreet, 1993; Overstreet et al., 2005) y WK (Lahmame y Armario, 1996; Lahmame et al., 1997), como modelos genéticos de depresión. En el nado forzado, los machos prepuberales (30-41 PN) de la cepa FSL y WK despliegan mayor tiempo de inmovilidad en comparación con sus cepas control; sin embargo, difieren en sus patrones de conducta social y en las respuestas fisiológicas que semejan estados tipo ansiedad, es decir, los niveles hormonales de corticosterona y ACTH son mayores en la cepa WK y menores en la FSL en comparación con sus respectivos controles (Malkesman et al., 2006). Sólo la cepa Wistar-Kyoto disminuye el consumo espontáneo de soluciones azucaradas, lo que se interpreta como un indicador de anhedonia (Malkesman et al., 2005), un síntoma cardinal de la depresión, por ello, se consideran ambas cepas como modelos de depresión infantil y particularmente la cepa Wistar-Kyoto para modelar un subgrupo de depresión ansiosa en edades tempranas (Braw et al., 2006).

## **2.8 Modelos de ansiedad en ratas**

En los modelos de ansiedad (ver tabla 2), se aprovecha el repertorio conductual natural de los animales ante estímulos perturbadores que generan respuestas de estrés en los animales, por ejemplo, los patrones de actividad exploratoria de las ratas de laboratorio expuestas a ambientes desconocidos o que son pocos seguros, donde el tiempo de exploración en los brazos abiertos en la prueba del laberinto de brazos elevados (Pellow y File, 1986), en el centro de la arena de la prueba de campo abierto (Hall, 1934), o en el compartimento iluminado de la caja de luz-oscuridad (Crawley y Goodwin, 1980) son indicadores de ansiedad (menor tiempo de permanencia en el campo iluminado, equivale a

mayor ansiedad); de igual manera, el tiempo que la rata dedica a enterrar un electrodo dentro de una caja llena con viruta es un indicador de los niveles de ansiedad en la prueba conocida como enterramiento defensivo (Treit et al., 1981). Estas pruebas se han utilizado para medir los efectos ansiolíticos de fármacos y otras sustancias como las hormonas gonadales y sus metabolitos (Kellog et al., 1991; Bitran et al., 1995, 1999; Gutiérrez-García et al., 2009).

**Tabla 2.** Modelos animales utilizados en el estudio de la ansiedad

<b>Respuestas condicionadas</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conflicto de Geller-Seifter</li> <li>• Conflicto de Vogel</li> <li>• Evitación activa/pasiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Respuesta emocional condicionada</li> <li>• Supresión condicionada a la ingesta de líquidos</li> <li>• Vocalizaciones ultrasónicas condicionadas</li> </ul>	
<b>Respuestas no condicionadas</b>		
<b>Pruebas exploratorias:</b>	<b>Pruebas Sociales:</b>	<b>Otras:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Campo abierto</li> <li>• Laberinto elevado en cruz</li> <li>• Transiciones luz/oscuridad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interacción social</li> <li>• Vocalizaciones ultrasónicas inducidas por separación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conducta defensiva de enterramiento</li> <li>• Hiponeofagia</li> </ul>

Tomado de Gómez et al., 2002

## **2.9 Modelo de enterramiento defensivo**

En el modelo original (Pinel y Treit, 1978) la prueba consiste en introducir a una rata en una caja de acrílico transparente (27 x 17 cm de base y 30 cm de altura), de una de las paredes (7.5 cm por encima del piso) sobresale un electrodo de cobre. El piso de la caja se cubre con una cama de viruta de aproximadamente 2mm de diámetro, cuya superficie queda 1 cm por debajo del electrodo. En la arena de enterramiento la rata inicialmente explora la caja y cuando incidentalmente toca el electrodo, recibe una descarga de corriente directa. La

prueba tiene una duración de 10 min a partir de que la rata recibe la primera descarga. Durante este tiempo se mide la latencia al enterramiento, que es el tiempo que transcurre desde que la rata recibe la primera descarga eléctrica hasta que empieza a enterrar el electrodo y la duración total de enterramiento, que es la suma del tiempo que la rata destina a enterrar el electrodo durante la prueba. La latencia es un indicador de la reactividad del animal ante el estímulo, que se usa para medir el umbral de respuesta, mientras que el incremento en el tiempo de enterramiento es proporcional a un comportamiento tipo ansioso (Pinel y Treit, 1978; Barret, 1991; Rodríguez-Manzo, 1999), dado que los fármacos utilizados en humanos por sus conocidos efectos ansiolíticos disminuyen el tiempo total de enterramiento en las ratas (de Boer y Koolhaas, 2003; Wilson et al., 2004).

### **2.10 Modelo de laberinto de brazos elevados**

Este modelo consiste en una plataforma con cuatro brazos en forma de cruz, unidos por un cuadro central, elevada a una altura de 50-100 cm por encima de suelo. La plataforma consta de dos brazos abiertos (50 x 10 cm) y dos brazos cerrados (50 x 10 cm) cubiertos por paredes opacas de 50 cm de alto (Pellow et al., 1985; Walf y Frye, 2007). Cuando se coloca a la rata sobre la plataforma, la cual representa un ambiente novedoso, el animal al parecer tiene el impulso de explorar a la vez que posee la característica innata de evitar los espacios abiertos por lo que explora más tiempo los brazos cerrados del aparato y evita los brazos abiertos (Pellow et al., 1985). Estas preferencias se han relacionado con estados tipo ansiedad ya que ratas confinadas al brazo abierto durante 20 minutos tuvieron concentraciones plasmáticas de corticosterona significativamente más elevadas en comparación con ratas que fueron confinadas a los brazos cerrados por el mismo periodo de tiempo (Pellow et al., 1985). Por lo tanto las variables que se miden en este modelo durante los 5 minutos que dura la prueba son el tiempo de permanencia y el número de entradas realizadas por el animal tanto en los brazos abiertos como en los cerrados, el número total de entradas y el porcentaje de entradas a los brazos abiertos. Nuestro grupo de investigación ha evaluado otras variables como los intentos exploración o entrada a los brazos

abiertos, seguidos de una respuesta de evitación y el asomo al borde con la cabeza en los espacios abiertos como una exploración hacia el vacío (Contreras et al., 2011). El modelo ha sido validado farmacológicamente ya que la administración de ansiolíticos eficaces en el humano como el diazepam incrementan el tiempo, el número y el porcentaje de entradas en el brazo abierto mientras que compuestos ansiogénicos como el pentilentetrazol disminuyen los valores de estas mediciones (Pellow et al., 1985; Walf y Frye, 2007).

### **2.11 Respuestas al estrés en etapas tempranas con modelos animales**

Las experiencias durante etapas tempranas del desarrollo modulan las respuestas conductuales y endocrinas al estrés en algunos roedores y primates incluyendo al ser humano (Heim y Nemeroff, 2001). La alteración de la relación madre-infante, produce efectos a corto y a largo plazo sobre la respuesta endocrina y conductual al estrés; por ejemplo, en los roedores de laboratorio, la separación materna breve provoca una respuesta adrenal atenuada (reducción en la secreción de corticosterona) en contraste con largos periodos de separación que provocan una respuesta exagerada al estrés, aumento del consumo de alcohol y un incremento exagerado de la respuesta de sobresalto (Bakshi y Kalin, 2002). En primates, se observan claramente los cambios conductuales pero no así los cambios endocrinos donde la reactividad hormonal al estrés es variable (van Oers et al., 1998; Lyons et al., 1999; Champoux et al., 2001).

Los efectos a largo plazo del estrés en etapas tempranas de desarrollo postnatal han sido extensamente estudiados, por ejemplo, en ratas macho, 30 min de restricción de espacio del día 7 PN al 13 PN incrementan la secreción de corticosterona plasmática ante un nuevo estímulo estresante (exposición a un ambiente novedoso) en la etapa adulta (Yoshihara y Yawaka, 2008). Sin embargo, aún son pocos los estudios que han evaluado los efectos del estrés de manera inmediata en etapas tempranas del desarrollo. Por ejemplo, en ratas genéticamente seleccionadas (modelo de herencia de hipertensión por estrés) la respuesta a estresores crónicos como el estrés impredecible semialeatorizado (la

restricción de espacio, el frío, el calor, las corrientes de aire y el ultrasonido), conduce a una disminución inmediata en la presión arterial durante la etapa prepuberal (32 PN) y a largo plazo (4 meses de edad), mientras que en ratas normotensas carece de efecto. En la etapa prepuberal (36 PN), el estrés impredecible, resulta ansiogénico en ambas cepas, disminuyendo el porcentaje de tiempo que el animal explora los brazos abiertos en el laberinto de brazos elevados, mientras que la manipulación repetida y gentil es ansiolítica únicamente en la cepa de ratas hipertensas. De la misma manera, los efectos a largo plazo dependen de la cepa, es decir, el efecto ansiolítico de la manipulación suave prevalece en ratas adultas hipertensas mientras que, el aumento en las conductas tipo ansiedad debido al estrés impredecible prevalece sólo en la cepa de ratas normotensas (Maslova et al., 2002). Estos datos ilustran efectos diferenciales dependiendo del tipo de estresor utilizado y de las características genéticas del individuo.

En otro estudio, el estrés neonatal agudo (3 mg/kg del glucocorticoide sintético dexametasona, vía s.c., ó 2 h de restricción de espacio en el día 7PN) disminuye el acicalamiento, la exploración vertical y el número de cuadros cruzados en el centro de la arena de campo abierto en la edad adulta. Estos cambios sugieren un incremento en la conducta emocional en campo abierto en ratas adultas, lo que se interpreta como ansiedad, en tanto que la manipulación prolongada (*handling*) produjo adaptación y menor emocionalidad (Gilad et al., 2000).

Otros de los estresores comúnmente utilizados en la investigación básica, son los choques eléctricos que suelen ser aplicados hasta con una intensidad de 0.1 mA de manera aguda o crónica con diferentes intervalos entre ellos. Empleando la aplicación de choques eléctricos a ratas en etapas tempranas del desarrollo y cuantificando la conducta de congelamiento en la etapa adulta, se ha propuesto que la segunda semana de edad es un periodo crítico para establecer

las respuestas adecuadas al estrés emocional en la etapa adulta (Matsumoto et al., 2005).

### **2.12 Modelo de enterramiento defensivo en etapas tempranas**

La prueba de enterramiento defensivo es un modelo de ansiedad que no depende de la experiencia previa del animal, pues la respuesta de enterramiento es emitida sin exposición previa a las condiciones de la prueba y ningún otro entrenamiento. Sin embargo, la respuesta de enterramiento es dependiente de la edad de los animales. Las ratas de 2 semanas de edad sometidas a esta prueba no despliegan esta conducta defensiva, la cual ha sido observada previamente hasta las tres semanas de edad (López-Rubalcava et al., 1996). Los tiempos de enterramiento observados a los 21 días de edad son más cortos en comparación con los que se observan en animales adultos (López-Rubalcava et al., 1996). El tiempo de enterramiento aumenta paulatinamente desde la semana 4 para alcanzar los niveles característicos de los adultos hacia la semana 11 (López-Rubalcava et al., 1996). En experimentos previos de nuestro grupo de trabajo, empleando el modelo original de enterramiento defensivo con la caja rectangular, se ha observado que a los 21 PN, el enterramiento de las ratas no siempre está dirigido a enterrar el electrodo, en ocasiones son ellas quienes se ocultan debajo de la viruta, y su conducta parece ser más bien desorganizado. Además, sólo aproximadamente el 30% (n=9) de los animales entierra el electrodo. Sin embargo, la rata infante tiene una notable actividad exploratoria, aunque como las adultas, prefiere merodear por las esquinas (Choleris et al., 2001). Por ello, decidimos en una primera etapa, ensayar una arena circular de enterramiento defensivo para probar el posible efecto de los ácidos grasos, ya que es posible que una arena circular que carece de esquinas y con un tamaño más reducido para el animal infantil disminuya el espacio de resguardo entre el electrodo y el animal aumentando el estrés y con ello la conducta de enterramiento.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los posibles efectos ansiolíticos de los ácidos grasos presentes en el líquido amniótico, calostro y leche materna han sido poco estudiados, aunque podrían ser los marcadores de reconocimiento en la vida extrauterina, después de una impronta intrauterina (Mendoza-lópez et al., 2010; Contreras et al., 2013). En conjunto, los componentes de estos líquidos biológicos constituyen un señal química olfatoria que asegura el reconocimiento de la madre con la cría (Marlier et al., 1997) y que contribuye a la transición de la vida intrauterina al ambiente postnatal (Schaal et al., 1995; Varendi et al., 1998; Guiraudie-Capraz et al., 2005), pero no se ha estudiado la acción de los ácidos grasos, a pesar de que ya se ha observado un efecto ansiolítico de líquido amniótico en ratas adultas; lo que en conjunto implica la posibilidad de que en ratas infantiles de 28 días PN, los ácidos grasos del líquido amniótico posean un efecto protector ante los efectos del estrés.

### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

Es desconocido si la administración aguda de ácidos grasos presentes en el líquido amniótico humano a ratas de 28 días PN tiene alguna acción protectora sobre el estrés agudo.

### **5. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar el posible efecto ansiolítico y antidesesperanza de los ácidos grasos presentes en el líquido amniótico humano en ratas en edad infantil utilizando modelos de depresión y ansiedad experimental.



## **5.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Comparar la conducta de enterramiento de ratas infantiles y prepuberales evaluadas en la arena rectangular, con la conducta de enterramiento de ratas infantiles evaluadas en la arena circular midiendo la latencia y la duración del enterramiento con el fin de desarrollar un protocolo de enterramiento defensivo que permita cuantificar efectos ansiolíticos en animales infantiles de 28 PN de acuerdo con sus características de exploración y motricidad.

2. Estudiar el efecto de la administración de 1mg/kg de diazepam sobre la conducta de ratas infantiles de 28 PN al variar el tamaño (grande Vs. chica) y la forma (rectangular Vs. circular) de la arena de enterramiento.

3. Determinar el efecto de la mezcla de ácidos grasos en concentraciones semejantes a las del líquido amniótico administrada a ratas de 28 PN y sometidas a una batería de pruebas conductuales de ansiedad (enterramiento defensivo y prueba de luz oscuridad) y depresión (nado forzado).

4. Ensayar el efecto de la mezcla de ácidos grasos en ratas de 28 PN sometidas únicamente al modelo de laberinto de brazos elevados para confirmar los efectos ansiolíticos de los ácidos grasos.

## **6. HIPÓTESIS**

Los ácidos grasos reducen las respuestas conductuales al estrés evaluadas en modelos experimentales para el estudio de la ansiedad y la desesperanza en el modelo de nado forzado en ratas infantiles.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Ética**

El presente trabajo fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las manipulaciones realizadas siguieron estrictamente la guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio (1995) promulgada por The National Institute of Health y los requerimientos de la ley mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

### **7.2 Animales**

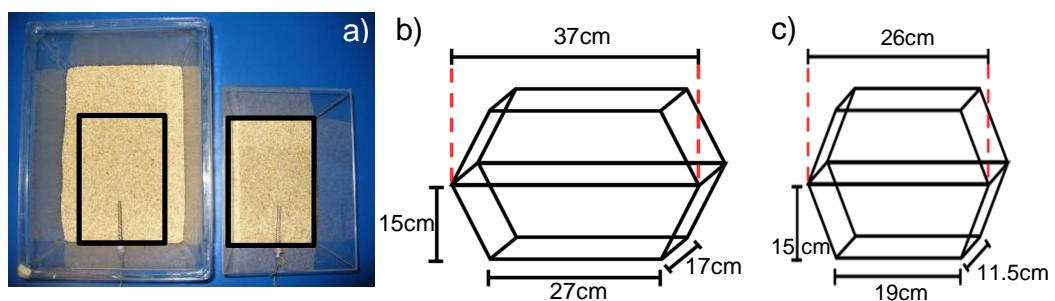
Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, machos y hembras, de 21 días de edad, nacidas y criadas en el bioterio de estancia del Laboratorio de Neurofarmacología perteneciente al Instituto de Neuroetología UV y Unidad periférica Xalapa del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. Desde el inicio de la gestación hasta los 21 días después del nacimiento, las crías permanecieron en el bioterio sin ser sometidas a manipulación alguna, con excepción de la limpieza de las cajas que se realizó cada cuarto día. Cuando las crías alcanzaron 21 días PN se separaron de la madre, se clasificaron por género y se les alojó en cajas de acrílico transparente, con una distribución aleatoria, en la que se evitó que algún grupo experimental estuviera formado exclusivamente por la misma camada. Antes y durante los experimentos todos los animales se mantuvieron en el bioterio con acceso *ad libitum* al agua y alimento y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h (encendido de la luz a las 7:00 am). Todas las pruebas conductuales se realizaron de las 12:00 a las 15:00 horas.

### **7.3 Pruebas conductuales**

#### **7.3.1 Prueba de enterramiento defensivo**

Enterramiento defensivo en la caja rectangular: La prueba de enterramiento en la caja rectangular se realizó en dos cajas de diferentes tamaños: una caja de

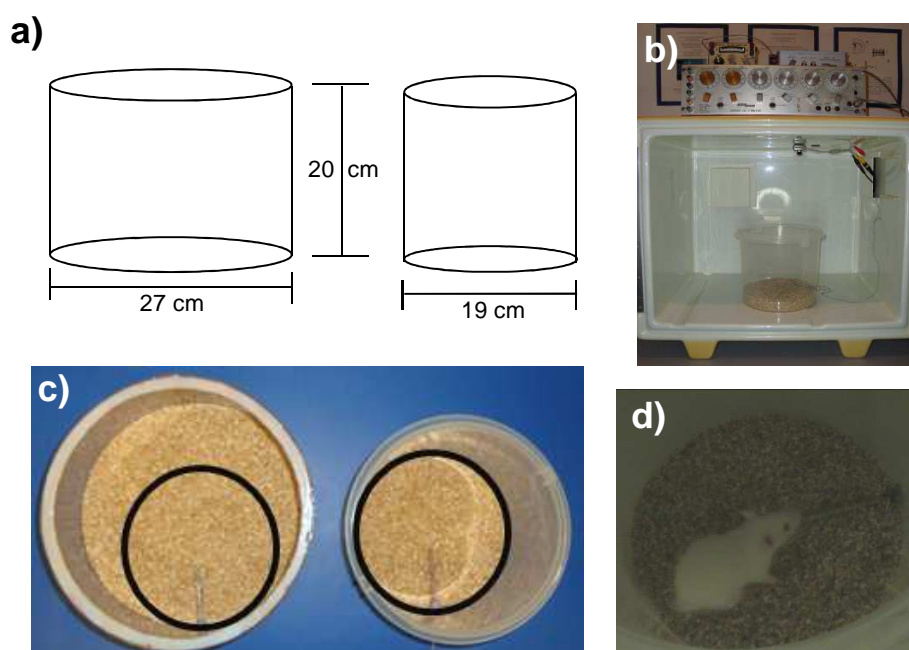
acrílico transparente (27 x 17 cm de base y 30 cm de altura, área: 560 cm<sup>2</sup>) con un electrodo de cobre insertado en una de las paredes a 7.5 cm del suelo la cual corresponde al modelo original (Pinel y Treit, 1978), mientras que la otra caja cuadrada era de menores dimensiones (19 x 11.5 cm de base y 30 cm de altura, área: 280.14 cm<sup>2</sup>). El piso de ambas la cajas se cubrió con una cama de viruta (Harlam®) de grano fino (2 mm de diámetro aprox.) cuya superficie quedó 1 cm por debajo del electrodo. La caja de enterramiento se colocó dentro de una caja sonoamortiguada (Coulbourn Instruments®), de dimensiones 55 x 40 x 46 cm. Estas características se han utilizado en estudios previos de nuestro grupo de trabajo (Saavedra et al., 2006; Gutiérrez-García et al., 2009). Una vez dentro, la rata explora la caja y cada vez que toca el electrodo recibe una descarga de corriente directa de 0.1 mA generada por un estimulador electrónico (Grass Instruments S44, Quincy, Massachusetts, USA) conectado en serie a una unidad de aislamiento (Grass Instruments SIU5) y a una unidad de corriente constante (Grass Instruments CCUIA) ver figura 3.



**Figura 3. Prueba de enterramiento defensivo en arenas cuadradas.** a) Área de las cajas cuadradas de enterramiento, b) y c) Dimensiones de las cajas cuadradas de enterramiento defensivo.

Enterramiento defensivo en la arena circular: La prueba en arena circular se llevó a cabo en dos diferentes arenas dependiendo del diseño experimental. Una caja cilíndrica de acrílico transparente (9.5 cm de radio de la base y 20 cm de altura, área: 283.5 cm<sup>2</sup>) y otra de mayores dimensiones (13.5 cm de radio de la base y 20 cm de altura, área: 559.9 cm<sup>2</sup>). En ambas se insertó un electrodo de

cobre sobre la pared a 3 cm por encima del piso el cual se conectó a un estimulador Grass® S-48 acoplado a una unidad de aislamiento SIU5. El piso de la caja se cubrió con una cama de viruta de grano fino (2 mm de diámetro aproximadamente) cuya superficie quedó a 0.5 cm por debajo del electrodo. La prueba consistió en colocar a la rata dentro de la caja de enterramiento, la cual se tapó con una placa de acrílico transparente y se colocó dentro de una caja sonoamortiguada (*Coulbourn Instruments®*) de dimensiones 55 x 40 x 46 cm. Una vez dentro, la rata exploró la caja y cuando tocó el electrodo, cerró el circuito y recibió una descarga de corriente directa de 0.1 mA. Ver figura 4.



**Figura 4. Prueba de enterramiento defensivo.** a) Dimensiones de las cajas circulares de enterramiento defensivo, b) caja circular dentro de caja sonoamortiguada y conectada a un estimulador eléctrico, c) área de las cajas circulares de enterramiento, d) rata de 28 PN dentro de la caja circular de enterramiento de menor área.

La prueba tuvo una duración de 10 min contabilizados a partir del momento en que la rata recibió la primera descarga eléctrica. Cada sesión fue videograbada para medir la latencia al enterramiento, que es el tiempo que transcurrió desde

que la rata recibió la primera descarga hasta que empezó a enterrar el electrodo, la duración total de enterramiento, que es la suma del tiempo que la rata destinó a enterrar el electrodo durante la prueba. La latencia es un indicador de la reactividad del animal ante el estímulo, que se usa para medir el umbral de respuesta mientras que el incremento en el tiempo de enterramiento indica el aumento de comportamiento tipo ansioso (Pinel y Treit, 1978; Barret, 1991; Rodríguez-Manzo, 1999; de Boer y Koolhaas, 2003).

### 7.3.2 Prueba de actividad locomotriz en campo abierto

Se realizó la evaluación de la actividad locomotriz para determinar la presencia de cambios de la motilidad que puedan influir sobre la actividad en la prueba de enterramiento defensivo. Además se midió la exploración vertical (rearing) la cual es indicadora del estado de reactividad de la rata ante un ambiente novedoso (Gilad et al., 2000). La rata se introdujo en el monitor de actividad motora (Leticia model LE 8811®, Panlab, España) con una base de perspex negra de 44 X 45 cm, rodeada de cuatro paredes de 36 cm de altura de perspex transparente. La prueba tuvo una duración de 5 min durante los cuales se registró automáticamente la actividad motora y la conducta de exploración vertical por medio de detectores infrarrojos conectados a un programa de análisis de datos Acti-track system ®, ver figura 5. Las variables medidas en el campo abierto fueron:

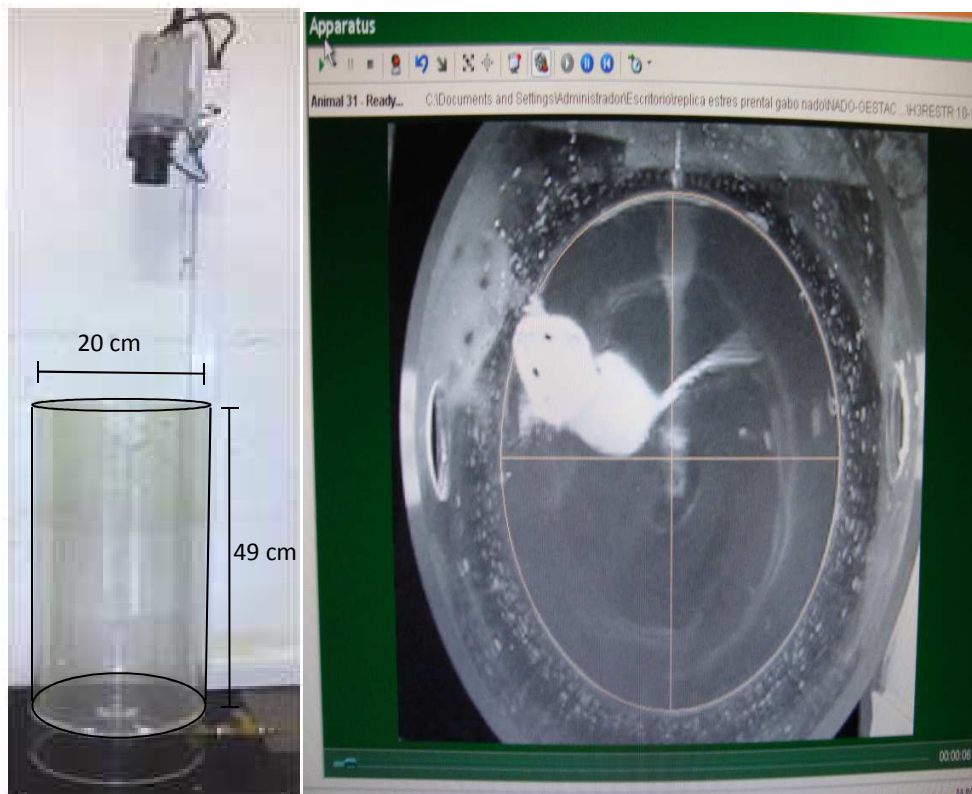
- Locomoción: es el número de veces que el animal se desplaza de una posición a otra durante los 5 minutos que dura la prueba.
- Distancia: Es la medición de la distancia en metros que el animal recorre dentro de la arena de campo abierto durante los 5 minutos de prueba.
- Exploración vertical: corresponde al número de veces que el animal adopta una posición erguida sobre sus patas traseras con la finalidad de explorar la arena de campo abierto.



**Figura 5. Prueba de actividad locomotriz.** Monitor automatizado de actividad locomotriz.

### 7.3.3 Prueba de nado forzado

La prueba de nado forzado se inició al introducir a las ratas a un estanque cilíndrico de acrílico transparente de 49 cm de alto (la rata no podía escapar) y 20 cm de diámetro que fue llenado con agua ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura) a una altura de 25 cm aproximadamente. La duración de la prueba fue de 15 minutos los cuales fueron divididos en tres periodos de 5 minutos para su análisis: periodo 0-5, 5-10 y 10-15 min. Durante este tiempo los animales fueron videograbados por medio de una cámara de video conectada a una computadora la cual registró cada prueba por medio del programa de computo de registro conductual Any-maze® de Stoelting Co. (Figura 6).

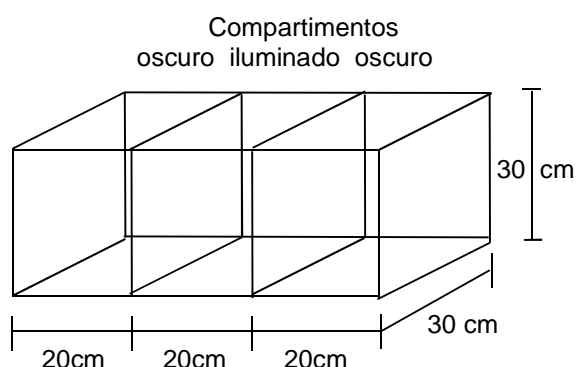
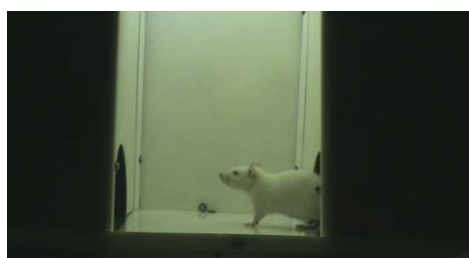


**Figura 6. Estanque de nado forzado del sistema Any-maze<sup>®</sup>.** Cilindro de Portsolt y cámara de video (izquierda) e interface de registro Any-maze<sup>®</sup> durante la prueba de nado forzado en ratas de 28 días de edad.

El programa mide de manera automatizada la distancia recorrida (m), el tiempo total de inmovilidad (seg), el número de inmovilidades y el número de cruces entre cuadrantes (n). Los criterios del programa se ajustaron de acuerdo con observaciones de nuestro grupo de trabajo a valores de 75% de sensibilidad de detección de movimiento, una sensibilidad de contraste alta, un criterio de grabación de una posición por segundo y un límite de detección de la inmovilidad de 1000 ms, es decir, el animal debió permanecer inmóvil durante 1 segundo o más para que el programa lo tomara como inmovilidad. La inmovilidad es un indicador de desesperanza conductual, equivalente a la falta de motivación experimentada en la depresión, que puede ser revertida con los antidepresivos eficaces en seres humanos (Porsolt et al., 1977; Nestler et al., 2002).

#### 7.3.4 Prueba de luz-oscuridad

La caja de luz oscuridad está formada por tres compartimentos iguales (20.3 x 30 x 30 cm) con accesos semicirculares de 15 cm de diámetro (ver figura 7). Las paredes, piso y techo de los compartimentos laterales son de color negro, mientras que el compartimento central es blanco y es el único iluminado con una lámpara circular de luz blanca de 22 watts durante los 5 minutos que dura la prueba. En la prueba la rata se coloca en el compartimento iluminado y se cuantifica el tiempo de permanencia en éste, como un indicador de la ansiedad. Los tiempos de permanencia cortos en el compartimento iluminado indican un estado tipo ansiedad, ya que las benzodiacepinas aumentan el tiempo de exploración en el compartimento iluminado lo que se interpreta como una reducción de las conductas ansiosas, en particular fotofobia (Crawley y Goodwin, 1980).



**Figura 7. Prueba de luz oscuridad.** Diagrama con medidas de la cámara de luz oscuridad (derecha) y foto del compartimento central (iluminado) durante la prueba en ratas de 28 días de edad.

#### 7.3.5 Modelo de laberinto de brazos elevados

El laberinto de brazos elevados consta de una plataforma de madera en forma de cruz con dos brazos abiertos de 50 x 10 cm pintados de color blanco y dos brazos cerrados de 50 x 10 x 40 cm de color negro (figura 8). La plataforma se



encuentra elevada a una altura de 50cm por encima del suelo dentro de una habitación acondicionada para el análisis conductual y aislada de ruidos externos. El día de la prueba los animales se trasladaron a la habitación de prueba una hora antes con la finalidad de que se habituaran a las condiciones ambientales y recibieran el tratamiento correspondiente. La prueba inició cuando la rata era colocada en el centro del laberinto con la cabeza orientada hacia el brazo abierto. La duración de la prueba fue de 5 minutos durante los cuales la rata podía explorar libremente el laberinto mientras era videograbada para el análisis conductual en el cual se midieron las siguientes variables:

- a) Tiempo de permanencia en brazos abiertos: Tiempo en segundos en el que la rata permanece en los brazos abiertos durante los 5 minutos de prueba.
- b) Entradas realizadas a brazos abiertos: Número de veces que la rata entra a los brazos abiertos.
- c) Entradas realizadas a brazos cerrados: Número de veces que la rata entra a los brazos cerrados.
- d) Porcentaje de entradas a brazos abiertos: Número de entradas a los brazos abiertos entre el número total de entradas tanto a brazos abiertos como a los cerrados multiplicado por 100.
- e) Tiempo y número de asomos al borde: Levantamiento y descenso de cabeza. Aproximación al borde de brazos abiertos. Cuando mira hacia el precipicio.
- f) Tiempo y número de intentos de exploración: Aproximación a espacios abiertos y movimientos de retracción, es decir, intentos de asomarse y explorar.

El criterio para considerar a un animal dentro de un brazo del laberinto era que este tuviera sus cuatro extremidades dentro del mismo brazo. Todos los animales fueron manipulados por el mismo investigador y las ratas que cayeron

del laberinto no se incluyeron en el análisis estadístico. Al finalizar cada prueba los brazos del laberinto se limpiaron con etanol al 5 %.



**Figura 8. Laberinto de brazos elevados.**

## **8. EXPERIMENTO 1: Comparación de la conducta de enterramiento en la arena circular (283 cm<sup>2</sup>) y la arena cuadrada (579.15 cm<sup>2</sup>)**

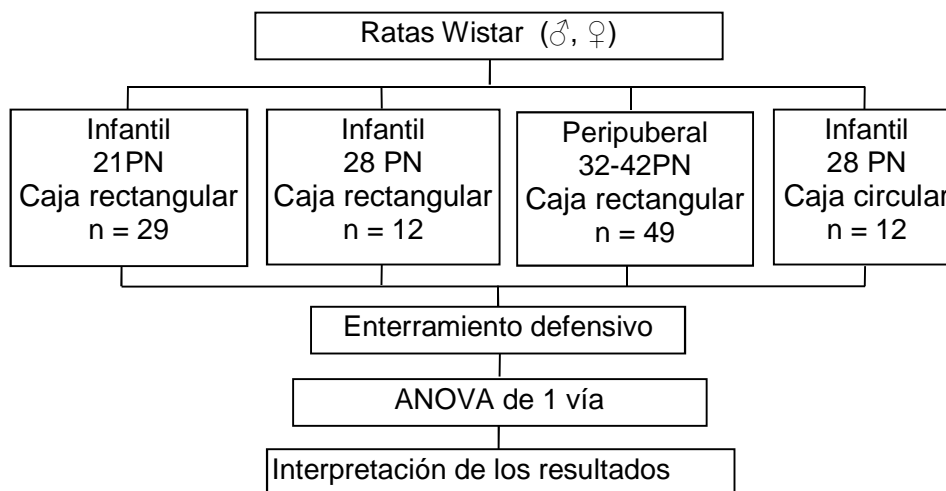
### **8.1 Objetivo**

Comparar la conducta de enterramiento entre la arena circular propuesta por nuestro grupo de trabajo y la arena rectangular del modelo original con el fin de desarrollar un protocolo de enterramiento defensivo que permita cuantificar efectos ansiolíticos en animales infantiles de 28 PN de acuerdo con sus características de exploración y motricidad.

### **8.2 Grupos experimentales**

Ratas Wistar de 21 días de edad PN (N = 102) obtenidas por apareamiento en nuestro bioterio, fueron destetadas y asignadas a uno de 4 grupos: un grupo infantil (21 PN, n = 29) que se sometió al enterramiento inmediatamente después del destete a los 21 días de edad; un grupo infantil de 28 PN y un grupo peripuberal (32-42 PN, n = 49) que se sometió al enterramiento defensivo en la arena rectangular entre los 32 a 42 PN. Estos tres grupos se sometieron a la prueba de enterramiento defensivo en la arena rectangular (27 x 33 x 16 cm) propuesta en el modelo original (Pinel y Treit, 1978) mientras que un cuarto grupo infantil (28 PN, n = 12) se expuso a la prueba de enterramiento defensivo en la arena circular (9.5 cm de radio de la base y 20 cm de altura) fabricada en el laboratorio. Desde su nacimiento hasta el término de los experimentos los animales permanecieron en un ciclo de luz oscuridad de 12 horas c/u con el encendido de las luces a las 7 am. La duración de la prueba en los tres grupos fue de 10 minutos los cuales fueron videograbados para su posterior análisis en el que se midió la latencia al enterramiento y el tiempo total de enterramiento como indicadores de ansiedad.

### 8.3 Diagrama de trabajo



### 8.4 Análisis estadístico

Los resultados del experimento uno se analizaron por medio de un ANOVA de una vía para determinar las diferencias entre los tres grupos en la latencia y el tiempo de enterramiento. Se utilizó el programa SigmaStat versión 3.5 y sólo se aceptaron como diferencias significativas, aquellas que alcanzaron  $p \leq 0.05$ , en cuyo caso se empleó como prueba post hoc el método de Student-NewmanKeuls. Los datos se representan como la media  $\pm$  el error estándar.

### 8.5 Resultados

#### 8.5.1 Latencia al enterramiento.

El ANOVA ilustró diferencias significativas en la latencia al enterramiento de los cuatro grupos [ $F(3, 101) = 18.959, p < 0.001$ ]. La prueba *post hoc* Student-Newman-Keuls demostró que la latencia fue menor en el grupo peripuberal de 32-42PN con respecto a los grupos de 21 y 28 PN de la arena rectangular. Sin embargo, los tres grupos evaluados en la arena rectangular tuvieron una latencia al enterramiento mayor con respecto a la latencia del grupo infantil examinado en la arena circular (Figura 9).

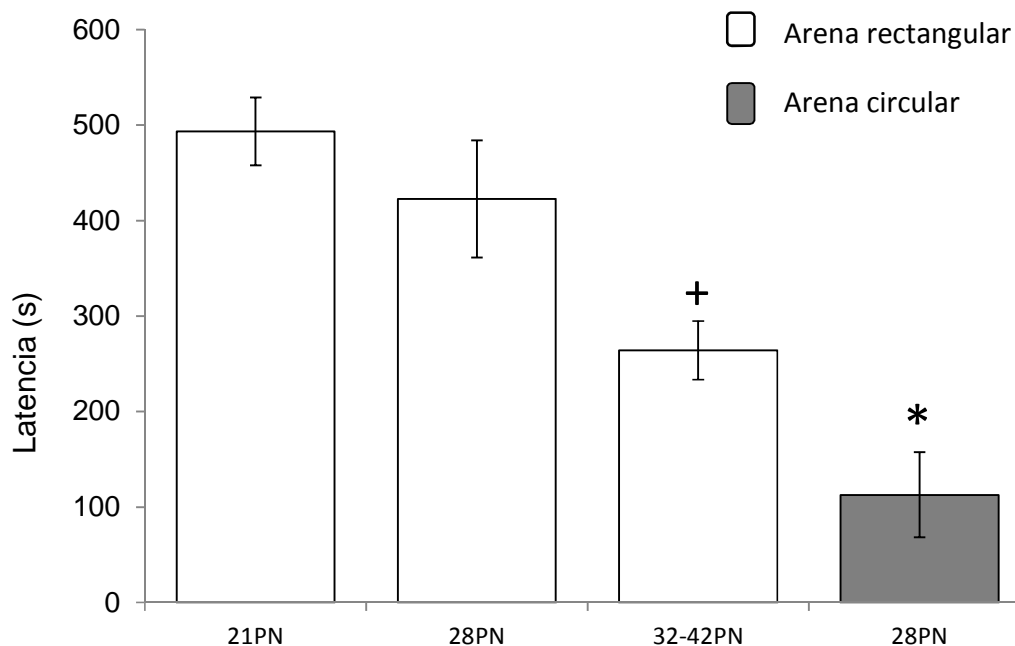


Figura 9. Latencia al enterramiento: comparación entre arenas de enterramiento. El grupo 32-42PN tuvo una menor latencia respecto a los grupos infantil 21 y 28 PN evaluados en la arena rectangular. El grupo infantil 28PN de la arena circular tuvo una latencia menor comparada con los tres grupos de la arena rectangular. Student-Newman-Keuls <sup>+</sup>p<0.001 vs 21 PN y 28 PN, \*p < 0.001 vs 21 PN, 28PN y 32-42PN en la arena rectangular.

### 8.5.2 Duración del enterramiento.

El ANOVA de 1 vía demostró diferencias significativas [ $F(3, 101) = 18.959$ ,  $p < 0.001$ ] entre los grupos de estudio. El análisis *post hoc* Student-Newman-Keuls demostró que el tiempo de enterramiento del grupo peripuberal 32-42PN fue mayor en comparación con los grupos infantiles de 21 PN y 28 PN en la arena rectangular, mientras que los animales del grupo infantil 28 PN que se examinaron en la arena circular tuvieron un tiempo de enterramiento de 3 a 10 veces mayor ( $175.7 \pm 23.22$ ) que los otros tres grupos examinados en la arena rectangular, ver figura 10. Con estos resultados se decidió realizar los siguientes experimentos en la arena circular.

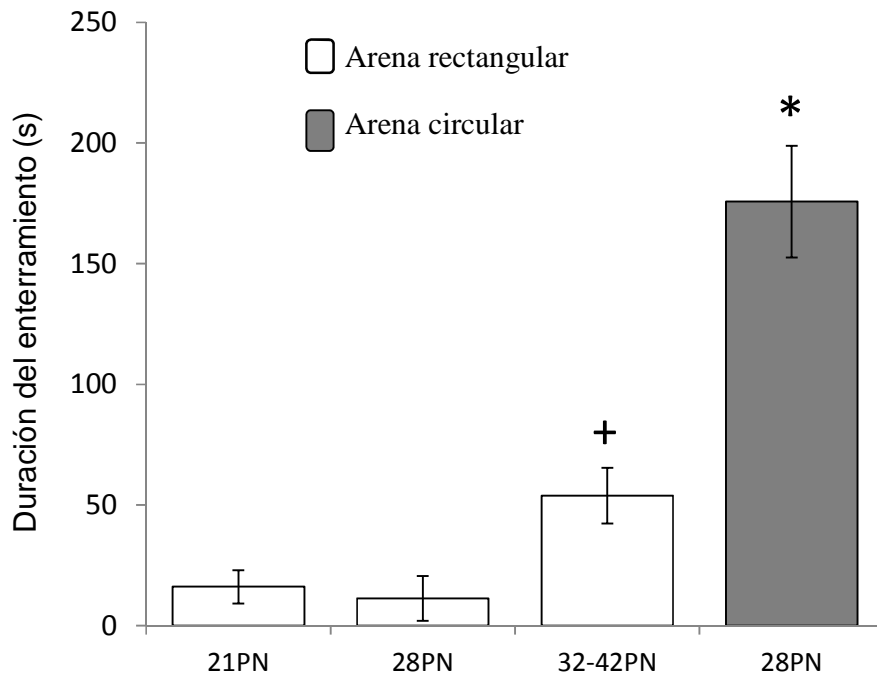


Figura 10. Tiempo de enterramiento: comparación entre arenas de enterramiento. El grupo 32-42PN tuvo un mayor tiempo de enterramiento con respecto a los grupos infantiles 21 y 28 PN evaluados en la arena rectangular. El grupo infantil 28 PN de la arena circular desplegó el mayor tiempo de enterramiento con respecto a los grupos evaluados en la arena rectangular. Student-Newman-Keuls  $^+p < 0.001$  vs Infantil 21 PN y 28 PN,  $*p < 0.001$  vs Infantil 21 PN, 28 PN y 32-42PN.

## **9. EXPERIMENTO 2: Control farmacológico con diazepam en la prueba de enterramiento defensivo variando el tamaño y la forma de la arena de enterramiento.**

### **9.1 Objetivo**

Estudiar el efecto de la administración de 1mg/kg de diazepam sobre la conducta de ratas infantiles de 28 PN al variar el tamaño (grande Vs. chica) y la forma (rectangular Vs. circular) de la arena de enterramiento.

### **9.2 Grupos experimentales.**

Con el objetivo de evaluar la efectividad del ansiolítico diazepam en la prueba de enterramiento defensivo al variar las condiciones de la arena de enterramiento, se utilizaron ratas Wistar obtenidas por apareamiento en nuestro bioterio, las cuales fueron destetadas a los 21 días de edad PN, y a los 28 PN se asignaron a uno de 8 grupos: dos grupos fueron probados en la arena cuadrada grande (560 cm<sup>2</sup>), un grupo vehículo (vehículo, arena cuadro grande; n = 13) al que se les administró 0.20 ml/rata de solución salina por vía intraperitoneal (i.p.) y un grupo que recibió una dosis de 1 mg/kg de peso de diazepam en un volumen de 0.20 ml por vía i.p. (diazepam, arena cuadro grande; n = 11) mientras que otros dos grupos se probaron en una arena circular de aproximadamente la misma área de la arena rectangular (560 cm<sup>2</sup>) con los mismos tratamientos (arena círculo grande vehículo, n = 12 y arena círculo grande diazepam, n = 15).

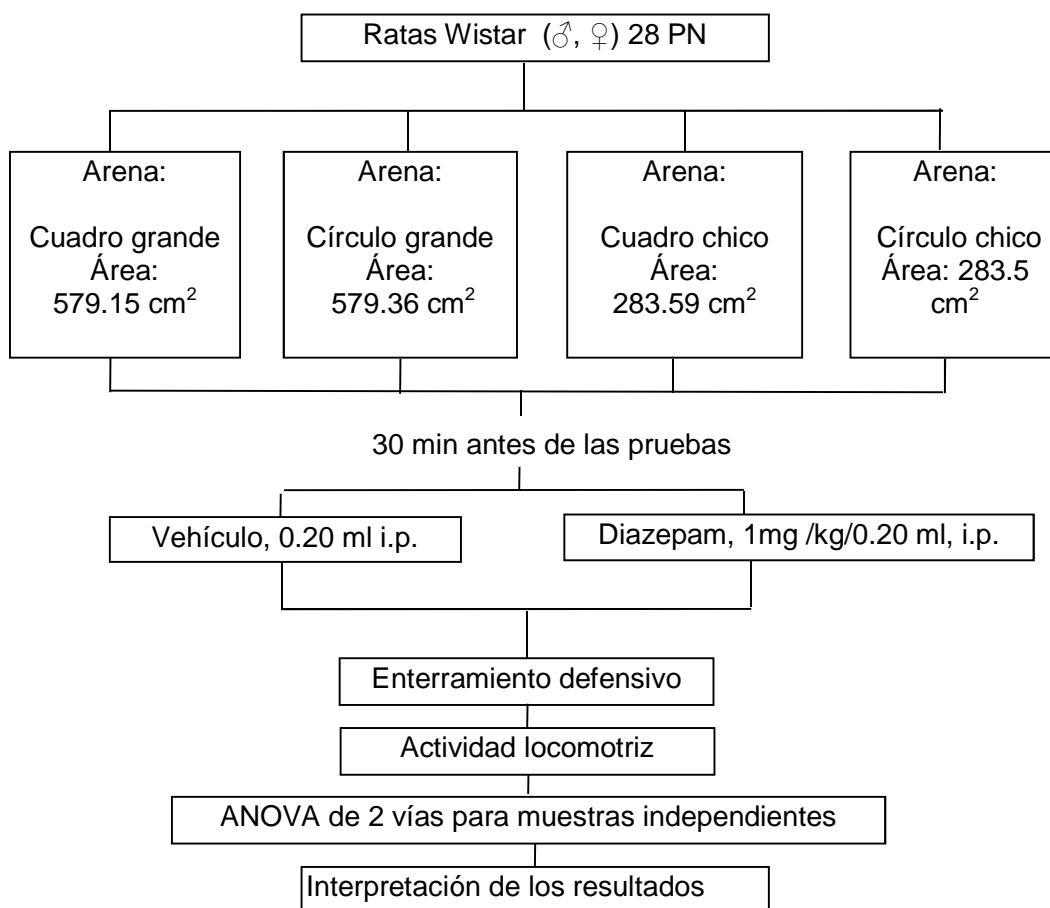
Otros 4 grupos también recibieron vehículo y diazepam pero se sometieron a la prueba de enterramiento en dos arenas de menor tamaño y diferente forma: arena cuadro chica (280.14 cm<sup>2</sup>) y arena círculo chica (283.5 cm<sup>2</sup>). Las inyecciones del vehículo o el diazepam se llevaron a cabo 30 min antes de las pruebas conductuales. Transcurrido este tiempo los animales se sometieron a la prueba de enterramiento defensivo en la arena circular durante 10 minutos para medir la latencia al enterramiento y el tiempo total de enterramiento como indicadores de ansiedad.

Además se incluyó el análisis de otras 4 conductas mutuamente excluyentes para determinar si las variaciones en la conducta de enterramiento por el diazepam también afectaban otras conductas. Las conductas analizadas fueron el tiempo de acicalamiento, el tiempo de exploración vertical, el tiempo de inmovilidad y el tiempo de actividad inespecífica. La conducta de acicalamiento se considera una conducta autodirigida de cuidado del pelaje caracterizada por movimientos repetitivos de lamido que empezaban en la nariz y las manos y avanzaban hacia la parte posterior de la cabeza, las orejas, y por último al vientre, dorso y extremidades posteriores. El registro del tiempo de exploración vertical inició cuando la rata exploraba la parte superior de la arena en posición vertical apoyando únicamente las patas traseras en el suelo, mientras que las patas delanteras podían estar suspendidas en el aire o apoyadas contra la pared. El tiempo de inmovilidad se tomaba cuando la rata permanecía quieta sin ningún tipo de movimiento y sin desplazarse en la arena de enterramiento. El resto de la actividad (ambulación, masticamiento de la viruta, olfateos) se registró junta y se analizó como tiempo de actividad inespecífica.

La obtención de este etograma completo de todas las conductas durante la prueba de enterramiento nos permite tener una idea más completa de cómo el tamaño y la forma de la arena influyen sobre el comportamiento de la rata y el efecto del diazepam. Desde su nacimiento hasta el término de los experimentos los animales permanecieron en un ciclo de luz oscuridad de 12 horas c/u con el encendido de las luces a las 7 am.



### 9.3 Diagrama de trabajo



### 9.4 Análisis estadístico

Las variables de enterramiento y de actividad locomotriz se analizaron por medio de una ANOVA de dos vías para grupos independientes. El factor uno fue la arena de enterramiento y el otro factor el tratamiento (vehículo o diazepam). También se analizó la interacción entre los factores. Cuando existieron diferencias ( $p < 0.05$ ) se realizó el análisis *post hoc* Student-Newman-Keuls. Los resultados se representan como la media  $\pm$  el error estándar de la media.

## 9.5 Resultados

### 9.5.1 Prueba de enterramiento defensivo

#### 9.5.1.1 Latencia al enterramiento.

La latencia al enterramiento fue diferente entre las arenas de prueba [ $F(3, 101) = 13.15, p < 0.001$ ], el análisis *post-hoc* Student-Newman-Keuls demostró que los animales ensayados en las dos arenas circulares y en la arena cuadrada chica tuvieron una menor latencia con respecto a la arena cuadrada grande (ver figura 11). El factor tratamiento también alcanzó la significancia estadística [ $F(1, 101) = 9.893, p < 0.002$ ], la latencia fue mayor en el grupo tratado con diazepam (ver figura 12); mientras que la interacción entre factores (figura 13) no fue significativa [ $F(3, 101) = 1.060, p = 0.369$ ].

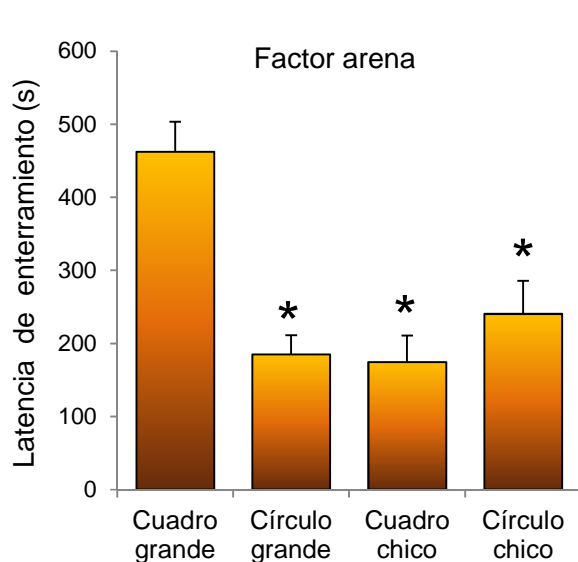


Figura 11. Latencia, factor arena: la latencia fue significativamente menor en los grupos con arena modificada respecto a la arena original del modelo (Student Newman Keuls, \* $p < 0.001$  vs arena cuadro grande).

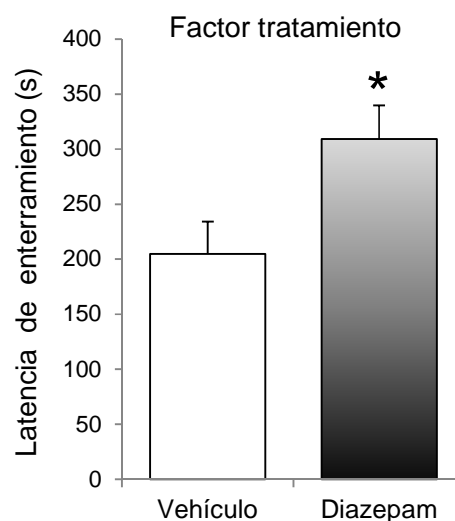


Figura 12. Latencia, factor tratamiento: la latencia fue significativamente mayor en el grupo diazepam respecto al vehículo (Student Newman Keuls, \* $p < 0.002$  vs vehículo).

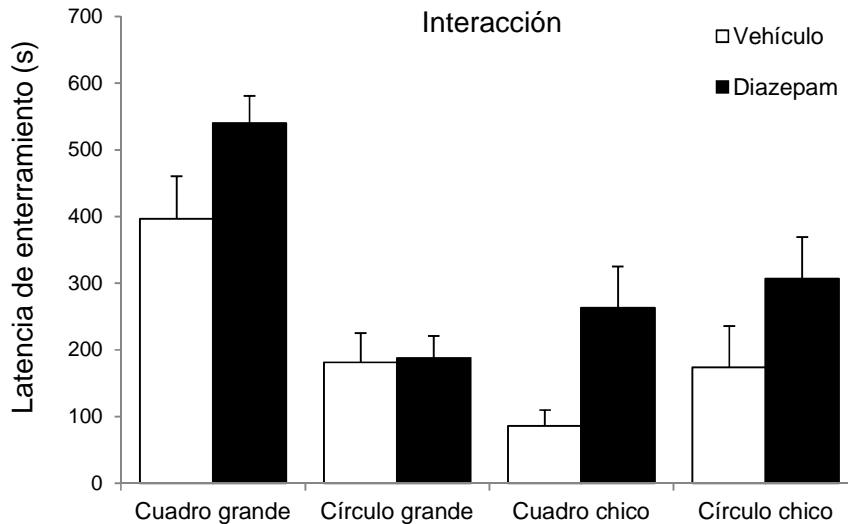


Figura 13. Latencia al enterramiento: Interacción entre factores. La interacción entre factores para la variable latencia no fue significativa.

#### 9.5.1.2 Duración del enterramiento

El análisis de la duración del tiempo de enterramiento demostró diferencias significativas entre las diferentes arenas [ $F(3, 101) = 10.549, p < 0.001$ ]. El tiempo de enterramiento fue mayor en las arenas circulares y la arena cuadrada chica con respecto a la arena cuadro grande (ver figura 14). El tratamiento también produjo un efecto significativo [ $F(1, 101) = 5.049, p < 0.027$ ], (ver figura 15). La interacción entre factores también fue significativa [ $F(3, 101) = 3.324, p < 0.023$ ], la prueba *post hoc* demostró que las ratas de las arenas modificadas que recibieron vehículo tuvieron un mayor tiempo de enterramiento respecto a la arena rectangular grande del modelo original, mientras que en las ratas de los grupos tratadas con diazepam el tiempo de enterramiento fue mayor sólo en la arena circular grande y la cuadrada chica respecto a la arena cuadrada grande ya que en la arena circular chica el diazepam redujo el tiempo de enterramiento a valores semejantes a los de la arena cuadrada grande (ver figura 16).

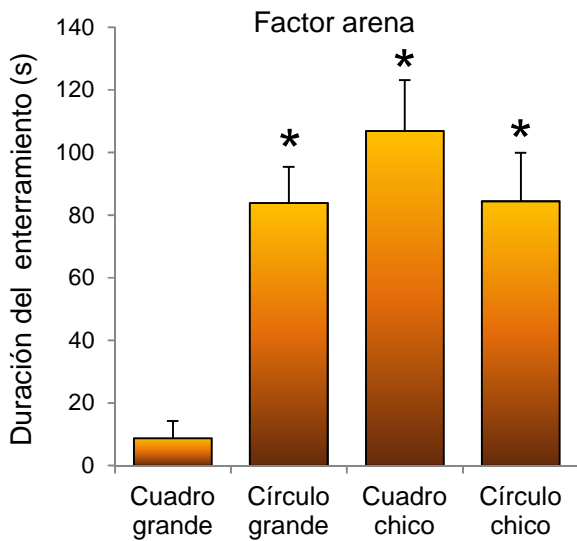


Figura 14. Duración, factor arena: la duración del enterramiento fue significativamente mayor en los grupos sometidos a las arenas modificadas respecto a la arena del modelo original (Student Newman Keuls, \* $p < 0.001$  vs arena cuadrado grande).

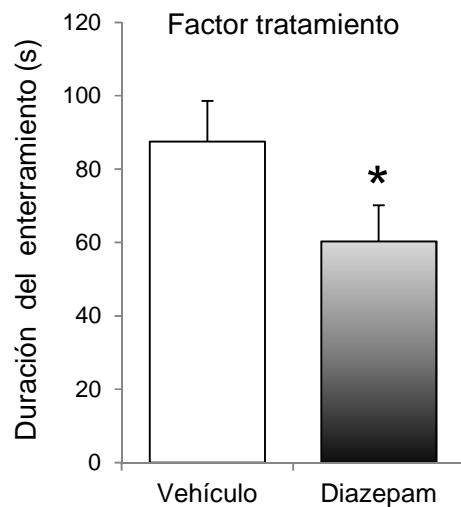


Figura 15. Duración, factor tratamiento: la duración de enterramiento fue mayor en el grupo con diazepam (Student Newman Keuls, \* $p < 0.05$  vs vehículo).

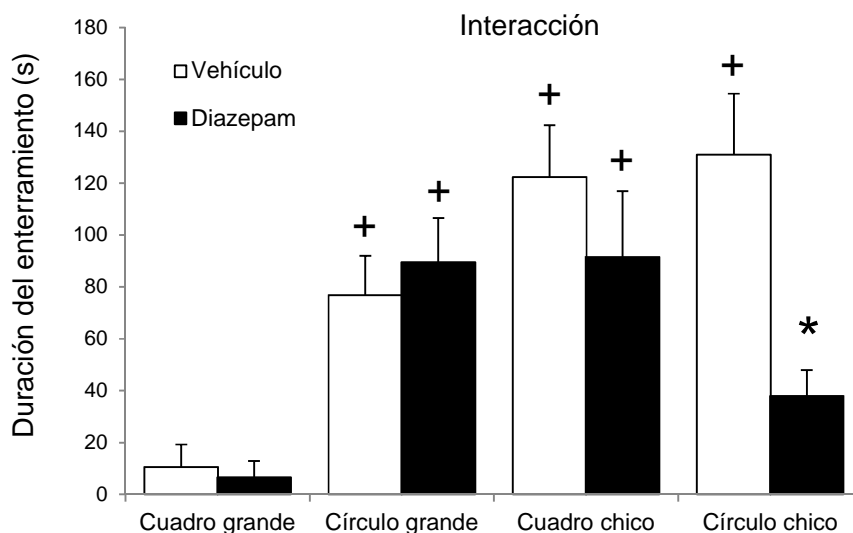


Figura 16. Duración del enterramiento: Interacción entre factores. La interacción entre factores para la duración fue significativa. Los grupos de círculo grande y cuadro chico con y sin diazepam tuvieron un mayor tiempo que los grupos de cuadro grande. El grupo de círculo chico vehículo tuvo un mayor tiempo de enterramiento respecto al cuadro grande mientras que en el grupo círculo chico con diazepam el tiempo de enterramiento fue diferente al de su vehículo y semejante al de los grupos de cuadro grande (Student Newman Keuls, + $p < 0.05$  vs cuadro grande, \* $p < 0.05$  vs círculo chico-vehículo).

### 9.5.1.3 Tiempo de acicalamiento

El tiempo de acicalamiento varió dependiendo de la arena de enterramiento [F (3,101) = 7.222,  $p < 0.001$ ], los grupos de las cajas modificadas tuvieron un menor acicalamiento que el grupo de la arena del modelo original, ver figura 17. El factor tratamiento no alcanzó la significancia estadística [F (1,101) = 0.305,  $p = 0.582$ ] (ver figura 18) y la interacción entre factores (figura 19) tampoco fue significativa [F (1,101) = 0.387,  $p = 0.763$ ].

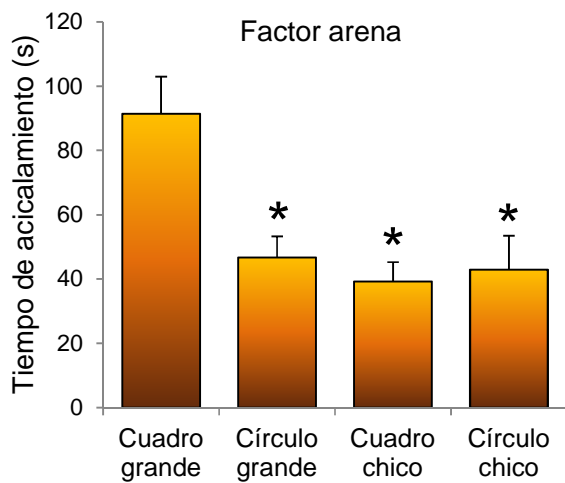


Figura 17. Tiempo de acicalamiento, factor electrodo: el acicalamiento fue menor en las arenas modificadas respecto a la arena cuadro grande correspondiente al modelo original (Student Newman Keuls, \*  $p < 0.05$  vs cuadro grande).

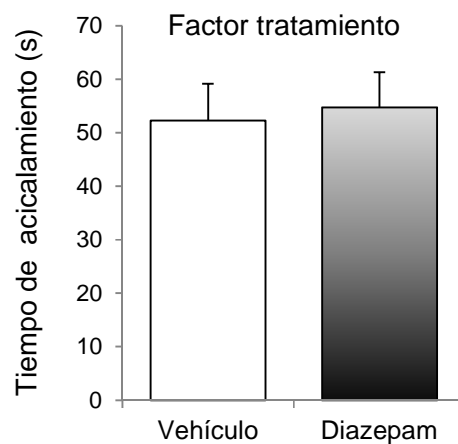


Figura 18. Tiempo de acicalamiento, factor tratamiento: el acicalamiento no fue diferente entre tratamientos.

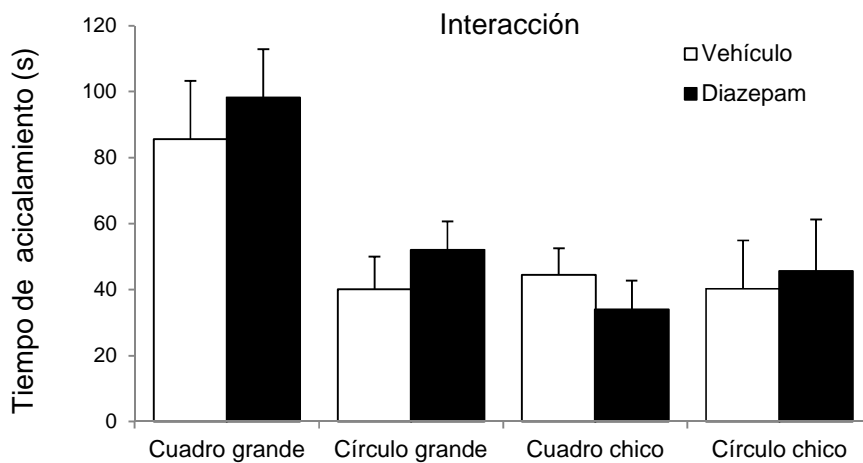


Figura 19. Tiempo de acicalamiento: Interacción entre factores. La interacción entre factores para la variable acicalamiento no fue significativa.

#### 9.5.1.4 Tiempo de exploración vertical

El análisis de la exploración vertical demostró diferencias significativas debidas a la arena de enterramiento [ $F(3,101) = 6.339, p < 0.001$ ] en donde los grupos de las arenas modificadas tuvieron un menor tiempo de exploración respecto a la arena cuadro-grande correspondiente al modelo original (ver figura 20). El tratamiento no alcanzó la significancia estadística [ $F(1,101) = 0.281, p = 0.597$ ], ver figura 21. La interacción entre factores tampoco fue significativa [ $F(3,101) = 0.0978, p = 0.406$ ], ver figura 22.

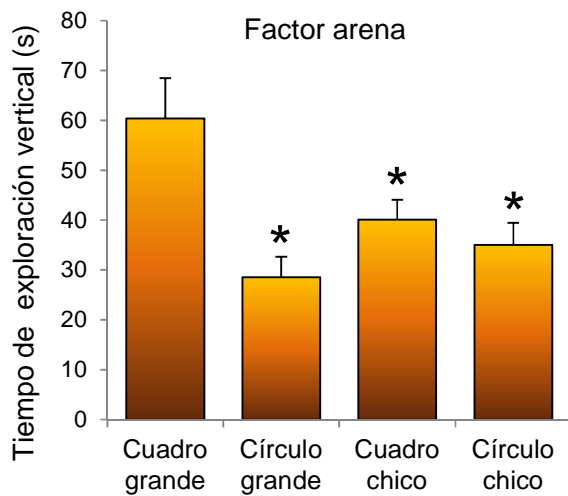


Figura 20. Tiempo de exploración, factor arena: la exploración vertical fue menor en los grupos de las arenas modificadas respecto a la arena propuesta en el modelo original (Student Newman Keuls, \* $p < 0.05$  vs cuadro grande).

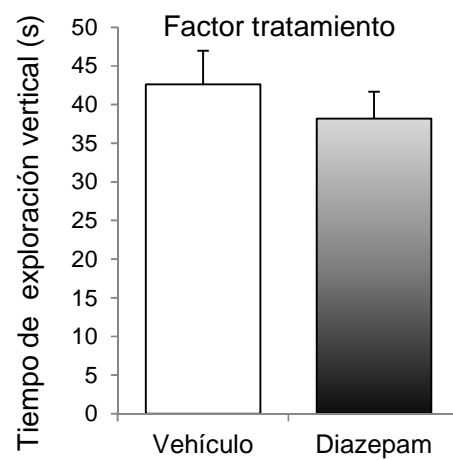


Figura 21. Tiempo de exploración, factor tratamiento: el tiempo de exploración no fue significativamente diferente entre tratamientos.

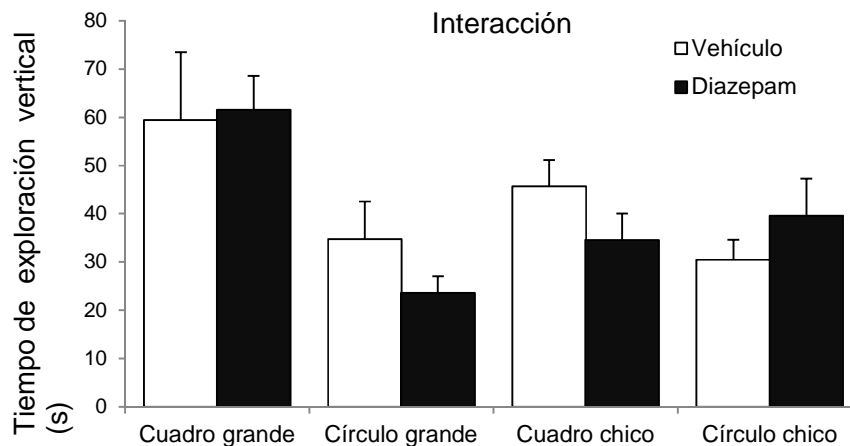


Figura 22. Tiempo de exploración vertical: Interacción entre factores. La interacción entre factores para la exploración no fue significativa.

### 9.5.1.5 Tiempo de Inmovilidad

El tiempo que las ratas permanecieron inmóviles fue significativamente diferente debido al factor arena [F (2,101) = 4.546,  $p < 0.005$ ], sólo la arena de círculo chico tuvo un tiempo de inmovilidad significativamente mayor con respecto a la arena de cuadro grande correspondiente al modelo de enterramiento original (figura 23). El factor tratamiento también alcanzó la significancia estadística [F (1,101) = 4.648,  $p < 0.033$ ], el diazepam aumentó el tiempo de inmovilidad con respecto al vehículo (ver figura 24). Por otro lado, la interacción entre factores (figura 25) no fue significativa [F (1,101) = 2.214,  $p = 0.091$ ].

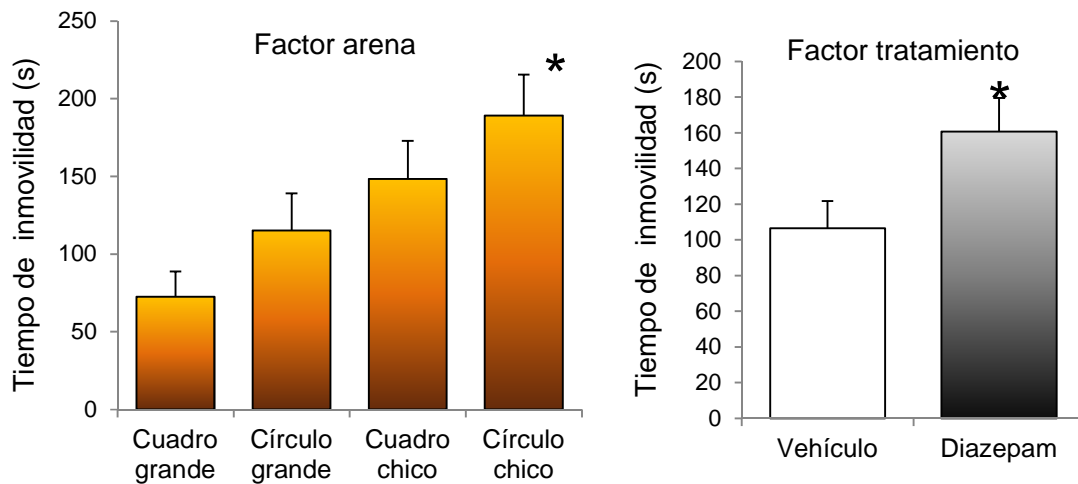


Figura 23. Tiempo de inmovilidad, factor arena: el grupo círculo chico tuvo un mayor tiempo de inmovilidad comparado con el grupo cuadro grande (Student Newman Keuls, \* $p < 0.05$  vs cuadro grande).

Figura 24. Tiempo de inmovilidad, factor tratamiento: la inmovilidad fue significativamente mayor en el grupo tratado con diazepam (Student Newman Keuls, \* $p < 0.05$  vs vehículo).

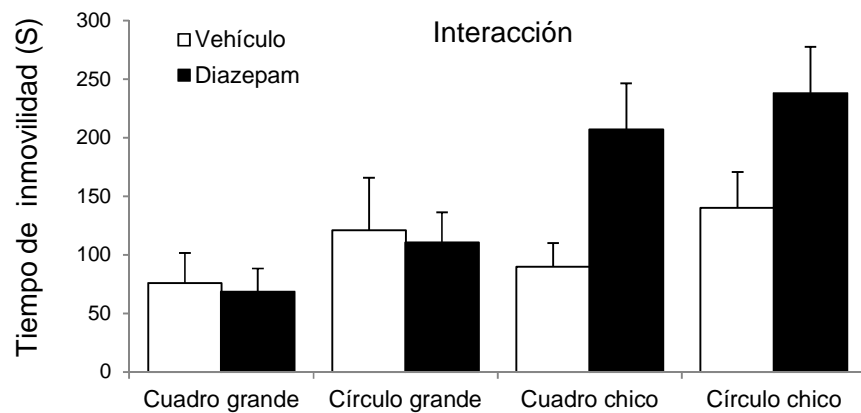


Figura 25. Tiempo de inmovilidad: Interacción entre factores. La interacción entre factores para la inmovilidad no fue significativa.

### 9.5.1.6 Tiempo de actividad inespecífica

El análisis del tiempo de actividad inespecífica demostró diferencias significativas debido al factor arena de enterramiento [F (3,101) = 13.364,  $p < 0.001$ ], los grupos de las arenas de menor área: cuadro chico y círculo chico tuvieron una actividad inespecífica menor con respecto a los grupos en arenas grandes: cuadro grande y círculo grande (ver figura 26). El tratamiento no produjo ningún efecto significativo [F (1, 101) = 2.349,  $p < 0.129$ ], ver figura 27. La interacción entre factores tampoco fue significativa [F (1,101) = 1.016,  $p = 0.389$ ], ver figura 28.

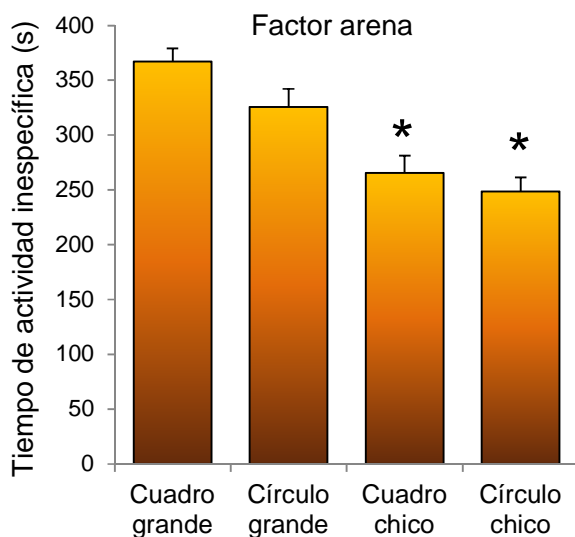


Figura 26. Tiempo de actividad inespecífica, factor arena: la actividad inespecífica fue significativamente menor en los grupos cuadro y círculo chico con respecto a los grupos cuadro y círculo grande (Student Newman Keuls,  $*p < 0.05$  vs cuadro grande y círculo grande).

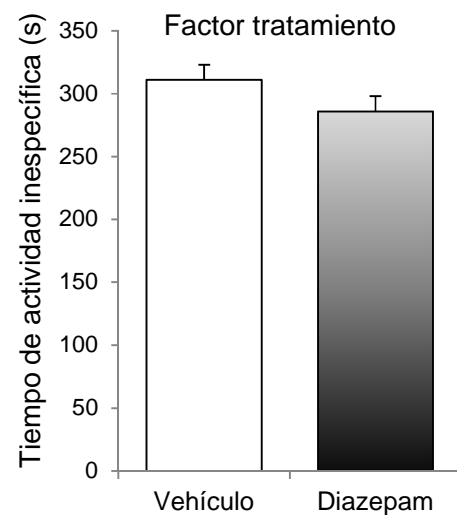


Figura 27. Tiempo de actividad inespecífica, factor tratamiento: no hubo diferencias significativas en la actividad inespecífica debidas al tratamiento.



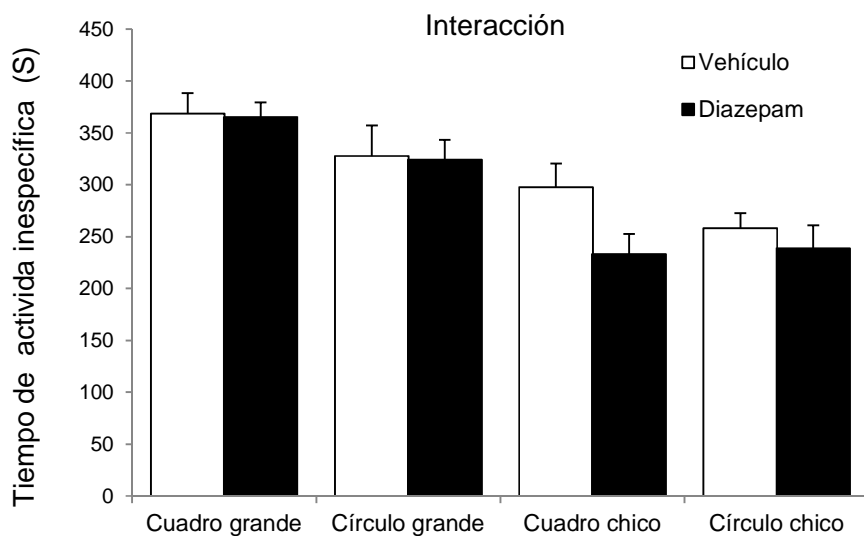


Figura 28. Tiempo de actividad inespecífica: Interacción entre factores. La interacción entre factores para la actividad inespecífica no fue significativa.

#### 9.5.1.7 Resumen de los resultados de enterramiento

La tabla 3 resume los datos del enterramiento mostrando cómo el cambio de tamaño forma o ambos afectaron las variables medidas. De la misma manera se resume el efecto del tratamiento con diazepam. De acuerdo con el cuadro podemos observar que aunque el cambio en la arena modifica varias conductas, solo la conducta de enterramiento (latencia y tiempo) y la inmovilidad son sensibles al tratamiento con diazepam.

Tabla 3 resumen de los resultados de enterramiento por factor.

variable/factor	Forma	Tamaño	Forma-tamaño	Diazepam
Latencia al enterramiento	↓	↓	↓	↑
Tiempo de enterramiento	↑	↑	↑	↓
Acicalamiento	↓	↓	↓	=
Exploración vertical	↓	↓	↓	=
Inmovilidad	=	=	↑	↑
Actividad inespecífica	=	↓	↓	=

↑ Aumentó, ↓ disminuyó, = sin cambio.

## 9.5.2 Prueba de actividad locomotriz

### 9.5.2.1 Locomoción

De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA de dos vías, se encontraron diferencias en la locomoción debidas al factor arena [ $F(3, 101) = 6.691, p < 0.001$ ], la locomoción fue mayor en el grupo círculo chico con respecto a los otros tres grupos. El factor tratamiento  $F(1, 101) = 0.316, p = 0.575$  y la interacción  $F(1, 87) = 0.653, p = 0.583$  no tuvieron diferencias significativas, ver tabla 4A.

### 9.5.2.2 Distancia recorrida

En el análisis del efecto de la arena de enterramiento se observó una diferencia significativa [ $F(3, 101) = 7.436, p < 0.001$ ] en la distancia recorrida en campo abierto entre el grupo círculo chico y los demás grupos. No se encontraron diferencias significativas debidas al tratamiento con vehículo y diazepam [ $F(1, 101) = 0.243, p = 0.623$ ] ni por la interacción entre factores [ $F(3, 101) = 0.222, p = 0.881$ ], ver tabla 4B.

### 9.5.2.3 Exploración vertical

De acuerdo al ANOVA de dos vías se observaron diferencias significativas [ $F(3, 101) = 7.767, p < 0.001$ ] en la exploración vertical debidas a la arena. Las ratas evaluadas en la arena circular chica emitieron más exploración vertical que las ratas evaluadas en las otras arenas. El factor tratamiento [ $F(1, 101) = 0.0748, p = 0.785$ ] y la interacción [ $F(3, 101) = 1.689, p = 0.174$ ] no fueron significativos (tabla 4C).

**Tabla 4 A. ANOVA de 2 vías para locomoción (n).**

Tratamiento	Vehículo	Diazepam	Totales
Arena			
Cuadro grande	786.6 ± 42.75	728.2 ± 70.35	759.9 ± 39.24
Círculo grande	683.5 ± 52.10	644.0 ± 49.90	661.5 ± 35.64
Cuadro chico	675.1 ± 44.34	628.3 ± 39.03	651.7 ± 29.35
Círculo chico	812.0 ± 57.91	876.7 ± 46.31	<b>844.3 ± 36.91*</b>
Totales	739.3 ± 25.55	715.8 ± 28.03	

Factor arena	F(3, 101) = 6.691, p < 0.001
Factor tratamiento	F(1,101) = 0.316, p = 0.575
Interacción	F(1,87) = 0.653, p = 0.583

**Tabla 4 B ANOVA de 2 vías para distancia recorrida (m).**

Tratamiento	Vehículo	Diazepam	Totales
Arena			
Cuadro grande	15.5 ± 1.17	14.0 ± 1.66	14.8 ± 0.98
Círculo grande	13.6 ± 1.38	13.0 ± 1.31	13.3 ± 0.93
Cuadro chico	11.9 ± 0.98	12.5 ± 1.07	12.1 ± 0.71
Círculo chico	17.7 ± 1.67	18.3 ± 1.59	<b>18.0 ± 1.10*</b>
Totales	14.8 ± 0.69	14.32 ± 0.75	

Factor arena	F(3, 101) = 7.436, p < 0.001
Factor tratamiento	F(1, 101) = 0.243, p = 0.623
Interacción	F(3, 101) = 0.222, p = 0.881

**Tabla 4 C. ANOVA de 2 vías para exploración vertical (n).**

Tratamiento	Vehículo	Diazepam	Totales
Arena			
Cuadro grande	25.8 ± 2.83	26.1 ± 3.95	26.0 ± 2.32
Círculo grande	25.4 ± 3.81	19.8 ± 2.42	22.3 ± 2.18
Cuadro chico	24.3 ± 2.94	19.2 ± 2.75	21.8 ± 2.03
Círculo chico	32.2 ± 3.60	39.9 ± 4.63	<b>36.0 ± 2.97*</b>
Totales	27.0 ± 1.66	26.0 ± 2.04	

Factor arena	F(3, 101) = 7.767, p < 0.001
Factor tratamiento	F(1, 101) = 0.0748, p = 0.785
Interacción	F(3, 101) = 1.689, p = 0.174

## **10. EXPERIMENTO 3: efecto de la administración de ácidos grasos en las pruebas de nado forzado, enterramiento defensivo y luz-oscuridad.**

### **10.1 Objetivo**

Ensayar el efecto de la mezcla de ácidos grasos en concentraciones semejantes a las del líquido amniótico administrada a ratas de 28 PN y sometidas a una batería de pruebas conductuales de ansiedad (enterramiento defensivo y prueba de luz oscuridad) y depresión (nado forzado).

### **10.2 Grupos experimentales**

Ratas Wistar de 28 días de edad PN (N = 57) fueron destetadas y asignadas a uno de tres grupos: un grupo vehículo (n = 19) al que se le administró 0.25 ml/rata de vehículo de ácidos grasos por vía subcutánea (s.c.), el grupo ácidos grasos (ácidos grasos, n = 19) al que se le administró 0.25 ml/rata de solución de ácidos grasos por vía subcutánea (s.c) y el grupo diazepam (n=19) que recibió una dosis de 1 mg/kg de diazepam en un volumen de 0.25 ml i.p. Las administraciones del vehículo y ácidos grasos se llevaron a cabo 24, 5 y 1 hora antes de las pruebas conductuales, mientras que el diazepam se administró una sola vez 1 hora antes de las pruebas. Transcurrido este tiempo los animales se sometieron una batería conductual que consistió en la prueba de nado forzado, los animales se secaron en cajas de estancia y una hora después fueron sometidos a la prueba de actividad locomotriz, enterramiento defensivo y luz oscuridad consecutivamente.

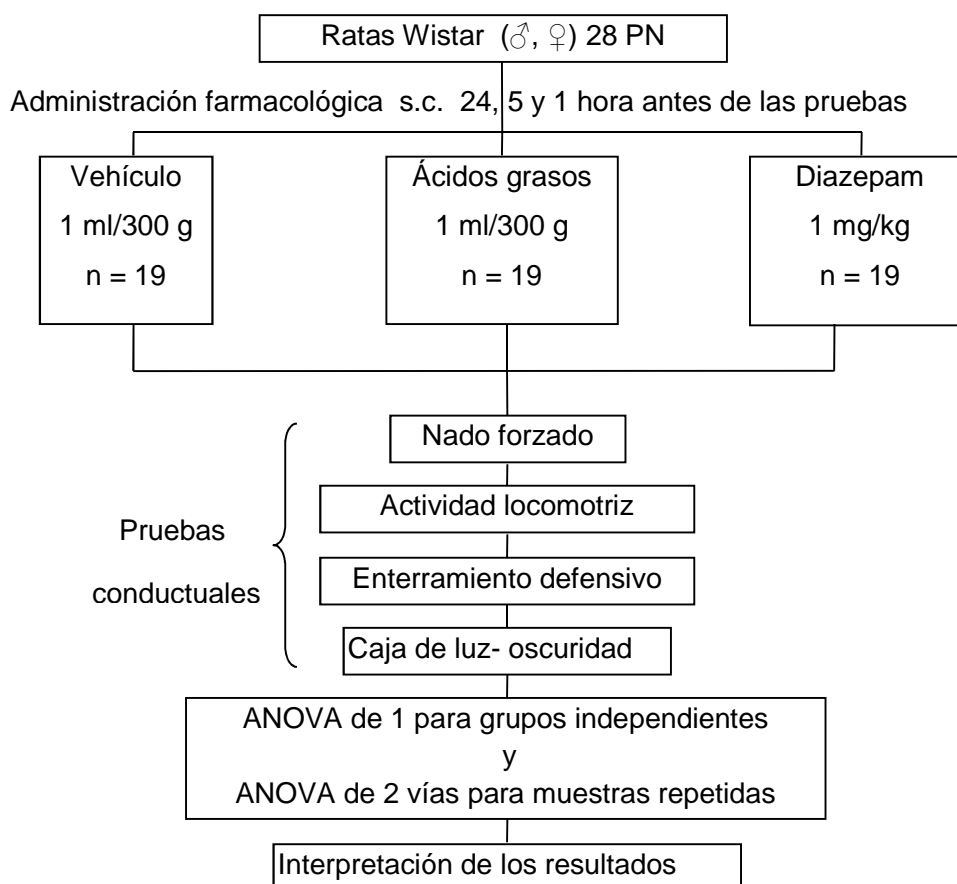
### **10.3 Solución de vehículo**

La solución vehículo se preparó con propilenglicol (J.T. Baker, México) y etanol absoluto (J.T. Baker, México) en una proporción 96% y 4% respectivamente.

#### 10.4 Solución de ácidos grasos

La solución de ácidos grasos contiene varios de los ácidos grasos que están presentes en el líquido amniótico humano. Cada 100 ml de solución de ácidos grasos contiene: ácido laurico (C12:0), 0.4mg; ácido mirístico (C14:0), 3.0 mg; ácido palmítico (C16:0), 15.3 mg; ácido palmitoleico (16:1), 7.1 mg; ácido esteárico (C18:0), 3.7 mg; ácido oleico (C18:1 cis), 8.0 mg; ácido elaídico (C18:1 trans), 1.5 mg; ácido linoléico (C18:2), 4.4 mg (Contreras et al., 2011). Todos los ácidos grasos fueron de grado analítico obtenidos de Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA y disueltos en solución vehículo.

#### 10.5 Diagrama de trabajo



## 10.6 Análisis estadístico

Las variables medidas en la prueba de nado forzado se analizaron por medio de un ANOVA de 2 vías para muestras repetidas tomando como factores el tratamiento y el periodo de nado en el que se midió a los animales y su interacción. En el caso de las pruebas de actividad locomotriz, enterramiento defensivo y luz oscuridad, estos resultados se analizaron por medio de un ANOVA de una vía para grupos independientes para determinar las diferencias entre los tratamientos experimentales. Cuando existieron diferencias ( $p < 0.05$ ) se realizó el análisis *post hoc* Student-Newman-Keuls. Los resultados se representan como la media  $\pm$  el error estándar de la media.

## 10.7 Resultados

### 10.7.1 Prueba de nado forzado

#### 10.7.1.1 Distancia

Las diferencias en la distancia recorrida relacionadas con los tratamientos (figura 29) no fueron significativas [ $F(2, 108) = 1.184, p = 0.314$ ]; pero la distancia recorrida si fue afectada por el periodo de nado forzado [ $F(2, 108) = 224.978, p < 0.001$ ]. La prueba *post hoc* Student Newman Keuls (SNK) señaló que la distancia recorrida disminuyó de manera significativa en el periodo 5-10 con respecto al periodo 0-5, mientras que la distancia del periodo 10-15 fue significativamente menor a la de los dos periodos anteriores (figura 30). La interacción entre factores (figura 31) no fue significativa [ $F(4, 108) = 1.451, p = 0.222$ ].

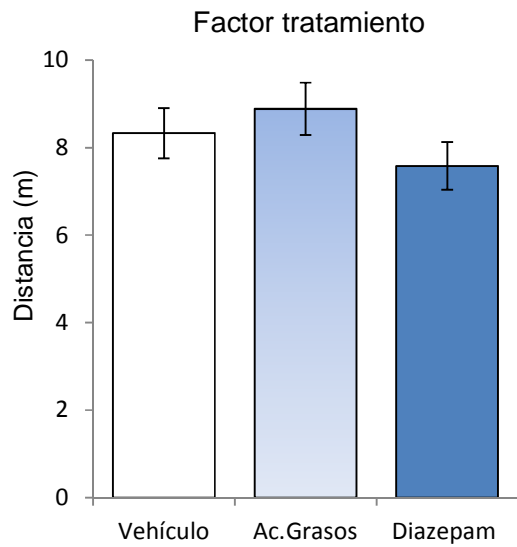


Figura 29. Distancia, factor tratamiento: No se observaron diferencias significativas entre tratamientos independientemente del periodo de prueba.

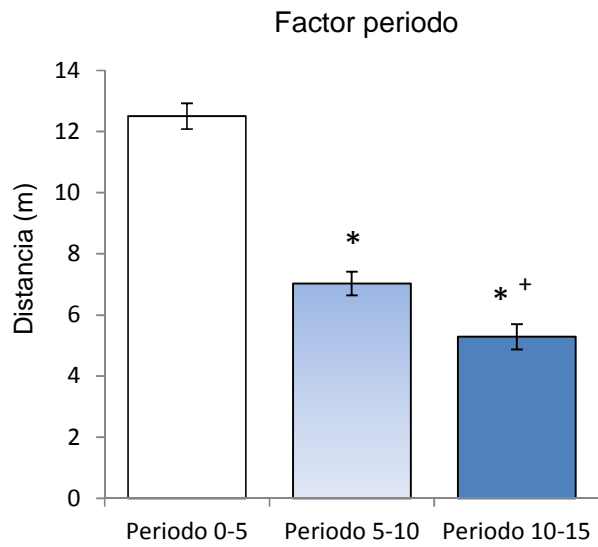


Figura 30. Distancia, factor periodo: la distancia disminuyó significativamente en el segundo y tercer periodo contra el primero y en el tercer periodo contra el segundo (Student Newman Keuls, \* $p < 0.05$  vs periodo 0-5 y + $p < 0.05$  vs periodo 5-10).

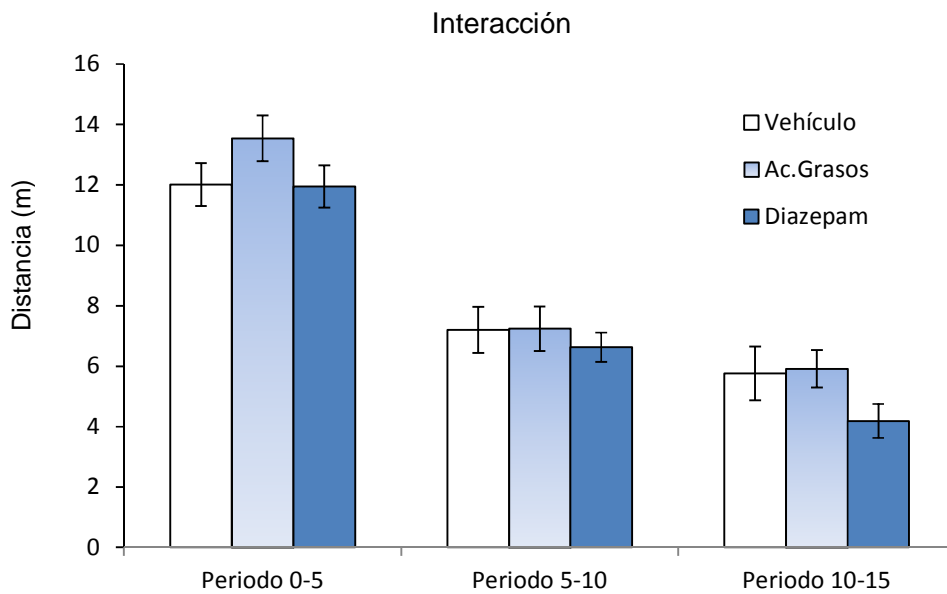


Figura 31. Distancia, interacción: la interacción de factores para la variable distancia no fue significativa.

### 10.7.1.2. Tiempo de inmovilidad

El ANOVA de 2 vías demostró que no se produjeron cambios significativos [F (2, 108) = 2.477, p = 0.093] debido al factor tratamiento (figura 32), aunque se observó una tendencia a que el tiempo de inmovilidad fuera mayor en el grupo tratado con diazepam. En cambio, el tiempo de inmovilidad fue significativamente diferente dependiendo del periodo de la prueba de nado forzado (figura 33), la duración de la inmovilidad fue mayor durante el segundo y tercer periodo con respecto al primer periodo, y en el tercer periodo respecto al segundo [F (2, 108) = 24.139, p < 0.001]. La interacción (figura 34) fue significativa [F (4, 108) = 4.633, p < 0.002]. la comparación múltiple de la prueba *post hoc* (SNK) indicó que el tiempo en el tercer periodo del grupo vehículo fue mayor al del primer periodo, por otro lado, únicamente en el grupo diazepam el tiempo de inmovilidad fue mayor en el segundo periodo del nado con respecto al primero, mientras el tiempo del tercer periodo fue mayor al de los dos periodos anteriores en este mismo grupo, además en el grupo diazepam el tiempo de inmovilidad del tercer periodo fue mayor al de los otros dos grupos en el mismo periodo.

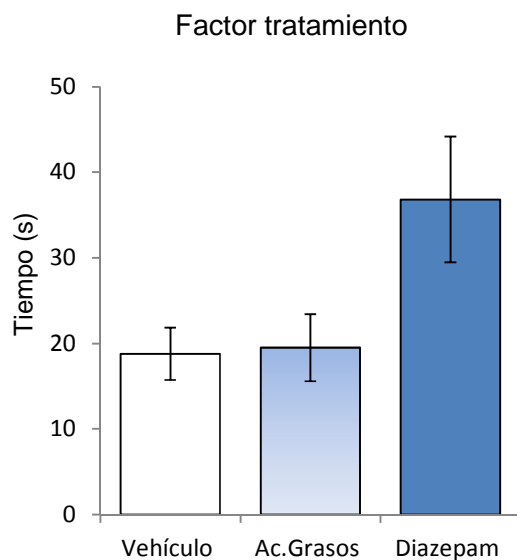


Figura 32. Tiempo de inmovilidad, factor tratamiento: No se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

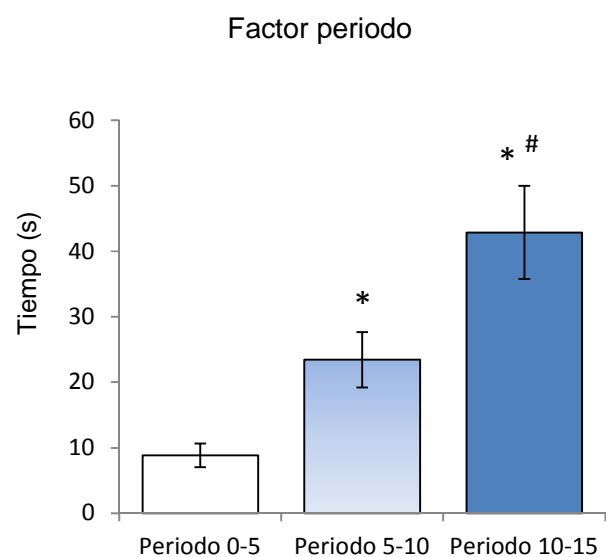


Figura 33. Tiempo de inmovilidad, factor periodo: el tiempo aumentó significativamente en el segundo y tercer periodo contra el primero (Student Newman Keuls, \*p < 0.05 vs periodo 0-5, # p < 0.05 vs periodo 5-10).



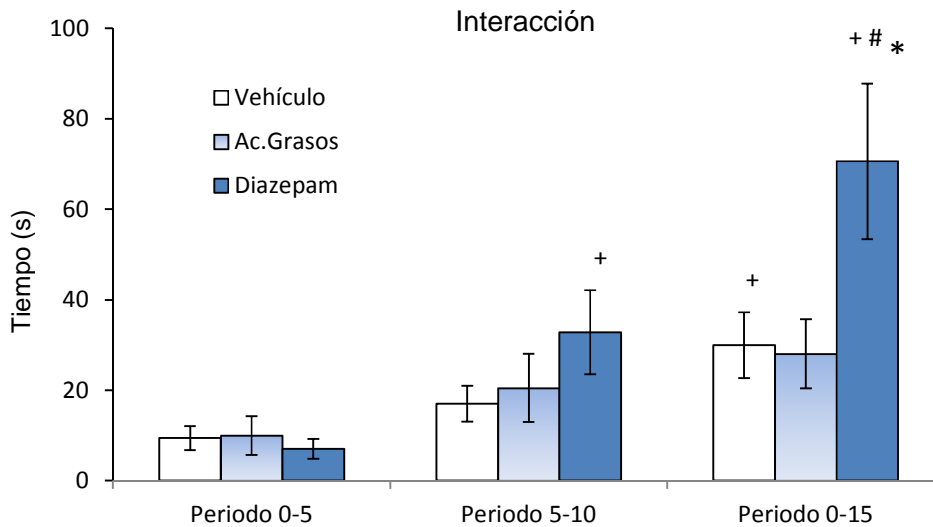


Figura 34. Tiempo de inmovilidad, interacción: el tiempo de inmovilidad fue mayor en el segundo periodo de nado respecto al primero y en el tercer periodo con respecto a los otros dos periodos de nado únicamente en el grupo diazepam, el cual en el tercer periodo tuvo un tiempo de inmovilidad mayor respecto al vehículo y los Ácidos grasos (Student Newman Keuls, <sup>+</sup>p < 0.05 vs periodo 0-5, <sup>#</sup>p < 0.05 vs periodo 5-10, <sup>\*</sup>p < 0.05 vs Vehículo y Diazepam).

### 10.7.1.3 Número de inmovilidades

Se encontró un incremento del número de inmovilidades entre los periodos de la prueba de nado forzado [ $F(2, 108) = 34.327$ ,  $p < 0.001$ ] independientemente de los tratamientos (figura 36), el análisis *post hoc* mostró que el número de inmovilidades aumentó en el segundo y tercer periodo de nado con respecto al primero y en el tercer periodo con respecto al segundo. Las diferencias entre los tratamientos (figura 35) no alcanzaron la significancia estadística [ $F(2, 108) = 1.168$ ,  $p = 0.319$ ]. La interacción entre factores fue significativa [ $F(4, 108) = 2.494$ ,  $p < 0.05$ ]. La comparación con la prueba *post hoc* SNK indicó que en el tercer periodo, el grupo vehículo y el de ácidos grasos tuvieron un mayor número de inmovilidades respecto al observado para cada grupo en el primer periodo, el grupo diazepam aumentó en número de inmovilidades en el segundo periodo de nado respecto al primero, mientras que en el tercer periodo el número fue significativamente mayor con respecto a los otros dos periodos y también con respecto al grupo vehículo y ácidos grasos del mismo periodo, ver figura 37.

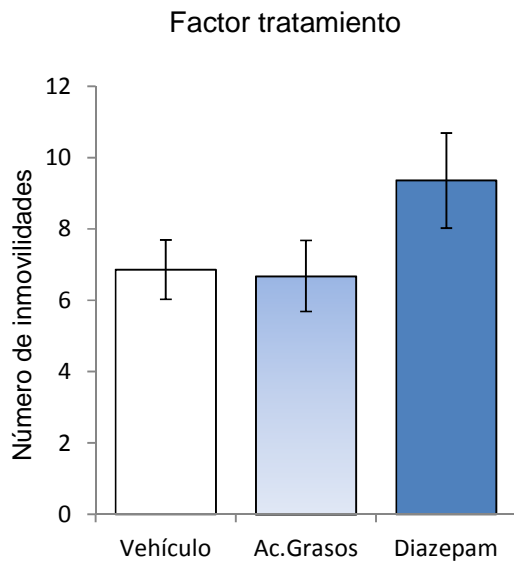


Figura 35. Número, factor tratamiento: No se observaron diferencias significativas en el número de inmovilidades entre tratamientos independientemente del periodo de prueba.

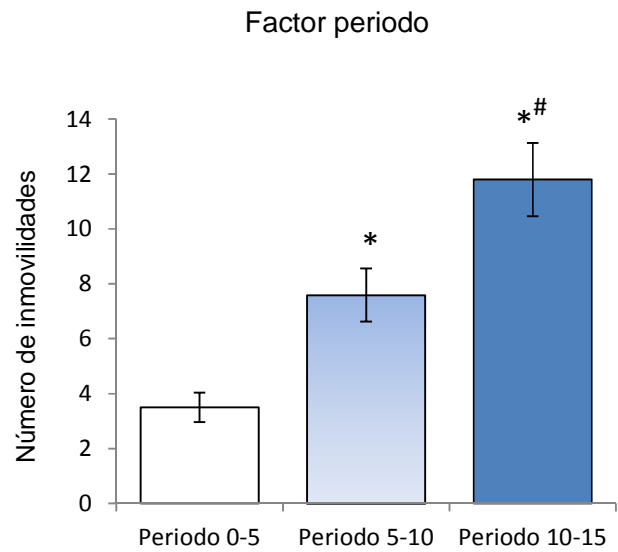


Figura 36. Número, factor periodo: el número de inmovilidades aumentó significativamente en el segundo y tercer periodo respecto al primer periodo de la prueba de nado (Student Newman Keuls, \*p < 0.05 vs periodo 0-5).

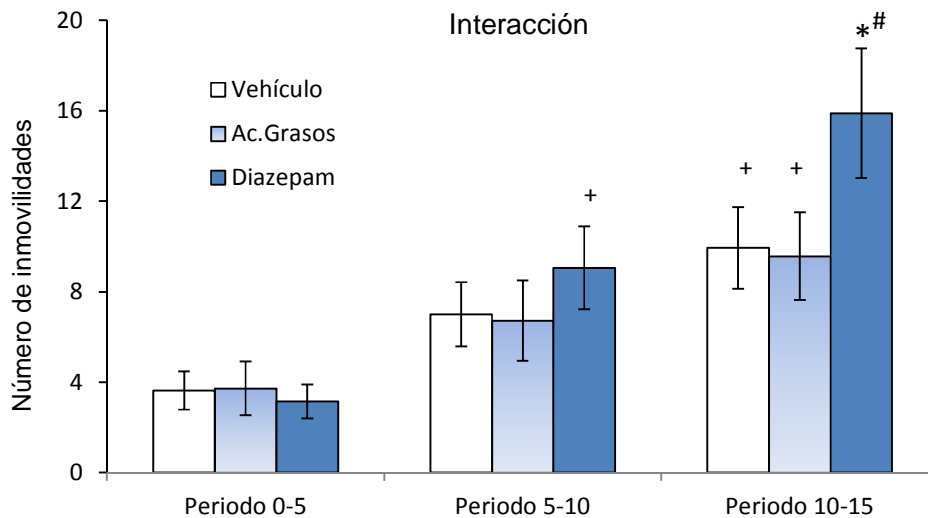


Figura 37. Número, interacción: La interacción entre factores fue significativa para el número de inmovilidades. Los tres grupos tuvieron un mayor número de inmovilidades en el tercer periodo de nado con respecto al primer periodo. Además, el grupo diazepam aumentó en número de inmovilidades en el segundo periodo de nado respecto al primero, mientras que en el tercer periodo el número fue significativamente mayor con respecto al primer periodo y a los otros grupos del tercer periodo (Student Newman Keuls, +p < 0.05 vs periodo 0-5, #p < 0.05 vs periodo 5-10, \*p < 0.05 vs vehículo y diazepam).

#### 10.7.1.4 Número de cruces

De acuerdo con el ANOVA de 2 vías, las diferencias en el número de cruces debidas al factor tratamiento (figura 38) no fueron significativas [F (2,108) = 1.552, p = 0.221]. En cambio, para el factor periodo (figura 39), el número de cruces disminuyó significativamente a lo largo del tiempo [F (2, 108) = 138.228, p < 0.001], la prueba *post hoc* SNK señaló que los cruces disminuyeron de manera significativa en el periodo 5-10 con respecto al periodo 0-5, mientras que los cruces del periodo 10-15 fueron significativamente menores a los cruces de los dos periodos anteriores independientemente de los tratamientos. La interacción entre factores fue significativa [F (4,108) = 2.558, p < 0.05]. La comparación con la prueba *post hoc* SNK indicó que el número de cruces fue menor en todos los grupos en el segundo y tercer periodo con respecto al primer periodo, además, únicamente en el grupo diazepam el número de cruces en el tercer fue menor con respecto al segundo periodo del mismo grupo y con respecto a los grupos vehículo y diazepam del tercer periodo (ver figura 40).

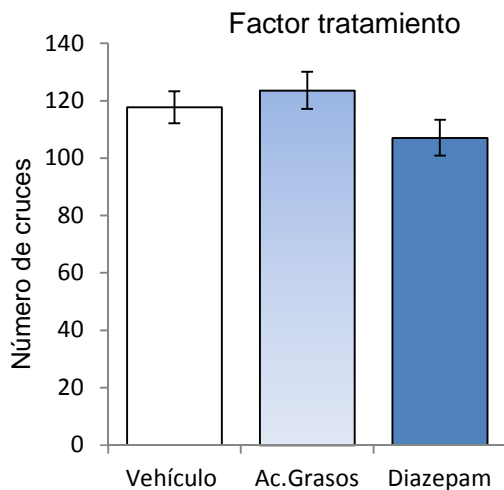


Figura 38. Número de cruces, factor tratamiento: No se observaron diferencias significativas entre tratamientos independientemente del periodo de prueba.

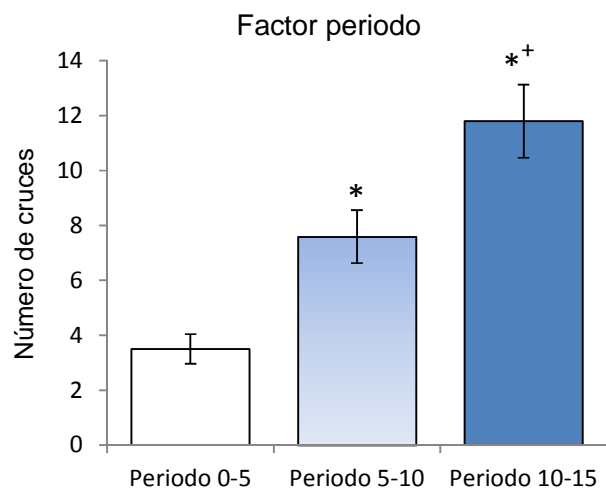


Figura 39. Número de cruces, factor periodo: los cruces disminuyeron significativamente en el segundo y tercer periodo contra el primero y en el tercer periodo contra el segundo (Student Newman Keuls, \*p < 0.05 vs periodo 0-5 y \*p < 0.05 vs periodo 5-10).

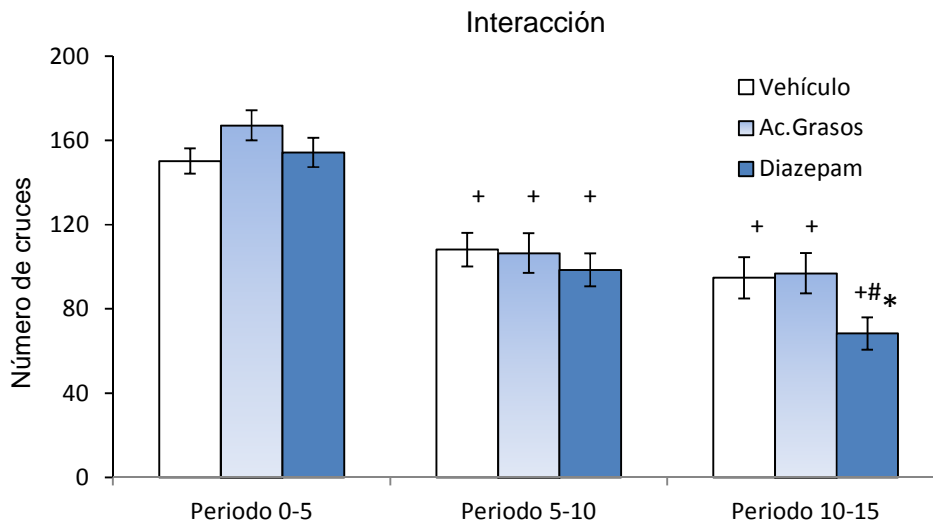


Figura 40. Número de cruces, interacción: el número de cruces fue menor en el segundo y tercer periodo de todos los grupos con respecto al primer periodo, únicamente en el grupo diazepam el número de cruces del tercer periodo fue menor con respecto al segundo periodo y con respecto al grupo vehículo y ácidos grasos del tercer periodo (Student Newman Keuls, <sup>+</sup>p < 0.05 vs periodo 0-5, <sup>#</sup>p < 0.05 vs periodo 5-10, <sup>\*</sup>p < 0.05 vs vehículo y diazepam).

### 10.7.2 Prueba de actividad locomotriz

De acuerdo con el ANOVA de 1 vía para muestras independientes no se observaron diferencias significativas entre grupos ni en la locomoción, ni en la distancia recorrida, ni en el número de exploración vertical (ver tabla 5).

**Tabla 5. Variables de actividad locomotriz y exploración vertical.** No se encontraron diferencias significativas entre grupos para las variables de locomoción, tiempo y número de exploración vertical.

PRUEBA	Vehículo n=19	Ácidos Grasos n=19	Diazepam n=19	VALOR DE F
Locomoción (número)	914.0 ± 28.74	809.63 ± 66.06	879.94 ± 60.98	F(2, 54) = 0.954, p = 0.392
Distancia recorrida (m)	19.25 ± 1.17	16.67 ± 1.73	18.71 ± 1.96	F(2, 54) = 0.676, p = 0.513
Número de exploración vertical	38.94 ± 5.07	31.31 ± 3.71	33.84 ± 4.55	F(2, 54) = 0.752, p = 0.476

### 10.7.3 Prueba de enterramiento defensivo

#### 10.7.3.1 Latencia al enterramiento

De acuerdo con el análisis estadístico, los grupos de ácidos grasos y de diazepam tuvieron una latencia al enterramiento significativamente mayor (Kruskal-Wallis,  $p < 0.02$ ) con respecto al grupo que recibió vehículo (ver figura 41).

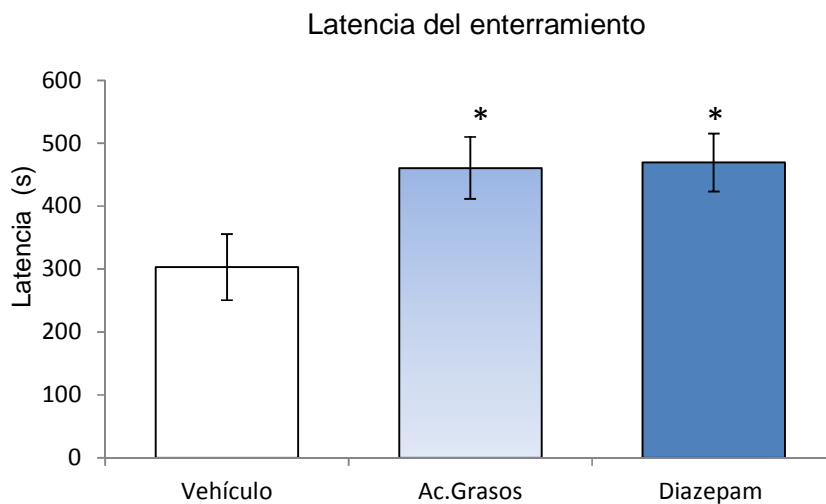


Figura 41. Latencia al enterramiento. La latencia al enterramiento de los grupos ácidos grasos y diazepam fueron significativamente mayores con respecto al grupo vehículo. Kruskal-Wallis, \* $p < 0.02$  vs vehículo.

#### 10.7.3.2 Duración del enterramiento

La duración del enterramiento alcanzó el criterio de significancia estadística (Kruskal-Wallis,  $p < 0.016$ ) de acuerdo con el análisis *post hoc* SNK, el grupo ácidos grasos y el grupo diazepam tuvieron un menor tiempo de enterramiento respecto al vehículo (ver figura 42).

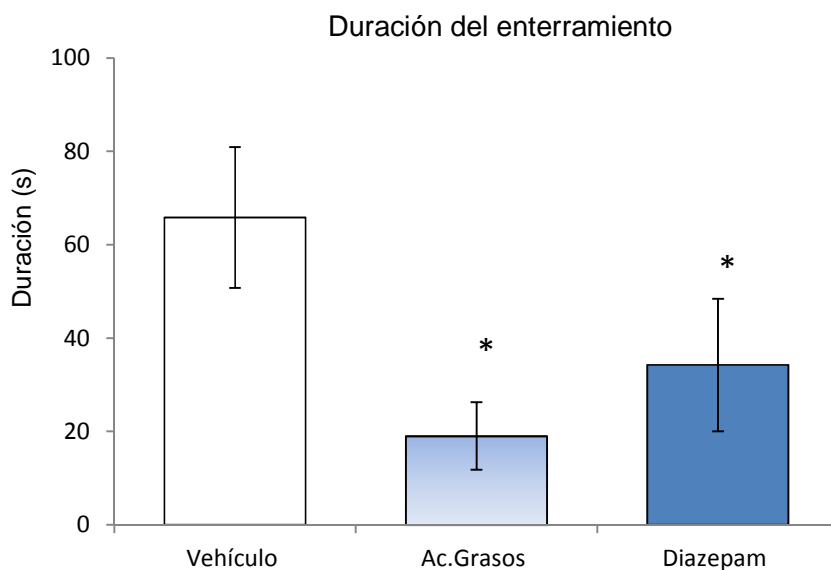


Figura 42. Duración del enterramiento. La duración del enterramiento de los grupos ácidos grasos y diazepam fue significativamente menor con respecto al grupo vehículo. Kruskal-Wallis, \* $p < 0.016$  vs vehículo.

#### 10.7.4 Prueba de luz/oscuridad

El ANOVA de una vía para muestras independientes no mostró diferencias significativas [ $F(2, 54) = 1.792, p = 0.176$ ] en la duración en el compartimento iluminado para ninguno de los grupos experimentales (figura 43).

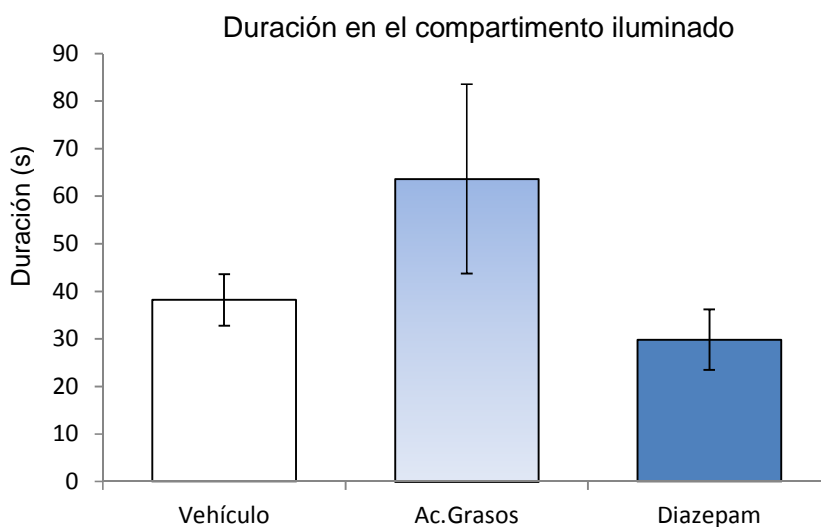


Figura 43. Duración en el compartimento iluminado. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos,  $F(2, 54) = 1.792, p = 0.176$ .

## **11. EXPERIMENTO 4: efecto de la administración de ácidos grasos en el modelo de laberinto de brazos elevados.**

### **11.1 Objetivo**

Ensayar el efecto de la mezcla de ácidos grasos en ratas de 28 PN sometidas únicamente al modelo de laberinto de brazos elevados para confirmar los efectos ansiolíticos de los ácidos grasos.

### **11.2 Grupos experimentales**

Ratas Wistar de 28 días de edad PN (N = 60) fueron destetadas y asignadas a uno de cuatro grupos experimentales: un grupo vehículo (96% propilenglicol y 4% etanol, 1 ml/250 g/rata, n = 12), un grupo que recibió la mezcla de ácidos grasos: 1 ml/250 g/rata (FAM, n = 19), un grupo que recibió solución salina 0.9% (n = 12) y un grupo al que se le administró diazepam (Valium® 10, Hoffman-Roche, Basel, Switzerland, 1 mg/kg/0.25 ml, n = 17) como control farmacológico. El vehículo y la mezcla de ácidos grasos se administraron 24, 5 y 1 hora antes de las pruebas conductuales mientras que el diazepam se administró 30 min antes de las pruebas (Contreras et al., 2011). Transcurrido este tiempo los animales se sometieron al modelo de laberinto de brazos elevados e inmediatamente después a la prueba de actividad locomotriz.

### **11.3 Solución de vehículo**

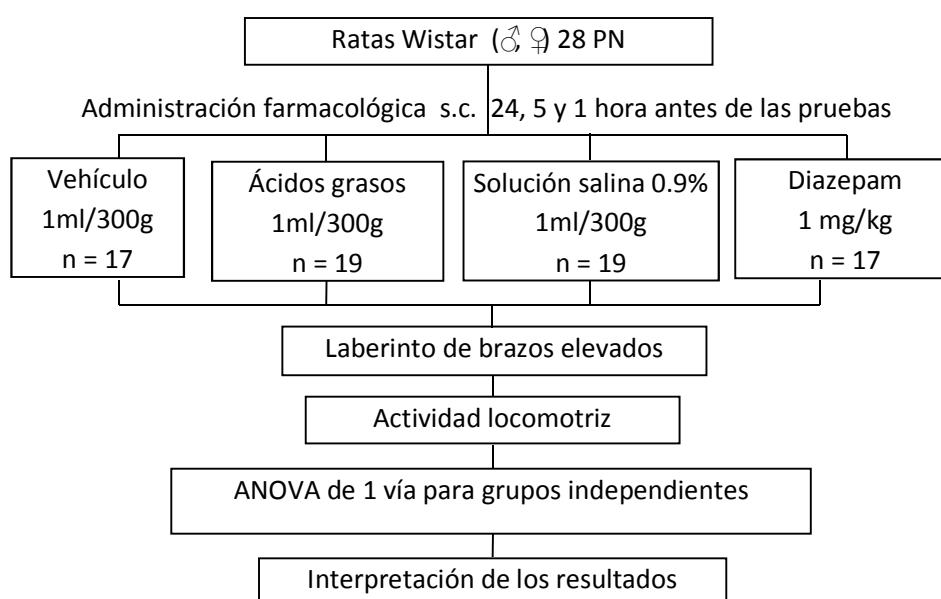
La solución vehículo se preparó con propilenglicol (J.T. Baker, México) y etanol absoluto (J.T. Baker, México) en una proporción 96% y 4% respectivamente.

### **11.4 Solución de ácidos grasos**

La solución de ácidos grasos contiene varios de los ácidos grasos que están presentes en el líquido amniótico humano. Cada 100 ml de solución de ácidos grasos contiene: ácido laurico (C12:0), 0.4mg; ácido mirístico (C14:0), 3.0 mg; ácido palmítico (C16:0), 15.3 mg; ácido palmitoleico (16:1), 7.1 mg; ácido

esteárico (C18:0), 3.7 mg; ácido oleico (C18:1 cis), 8.0 mg; ácido elaídico (C18:1 trans), 1.5 mg; ácido linoléico (C18:2), 4.4 mg (Contreras et al., 2011). Todos los ácidos grasos fueron de grado analítico obtenidos de Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA y disueltos en solución vehículo.

### 11.5 Diagrama de trabajo



### 11.6 Análisis estadístico.

Las variables medidas en el modelo de laberinto de brazos elevados y la prueba de actividad locomotriz se analizaron por medio de un ANOVA de 1 vía para muestras independientes para determinar las diferencias entre los tratamientos experimentales. Cuando las diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ ) se utilizó el análisis Student-Newman-Keuls como prueba *post hoc*. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar. Sólo las diferencias con  $p \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativas.



## 11.7 Resultados

### 11.7.1 Laberinto de brazos elevados

Los tratamientos modificaron significativamente el tiempo de exploración en el brazo abierto [ $F(3, 56) = 5.923, p < 0.001$ ]. El análisis *post hoc* demostró que el tiempo de permanencia en los brazos abiertos fue mayor en los grupos de la mezcla de ácidos grasos y diazepam ( $p < 0.05$ ) con respecto a los vehículos (propilenglicol:etanol, 96:4 y solución salina), ver figura 44a.

El número de entradas al brazo abierto fue diferente entre tratamientos [ $F(3, 56) = 9.955, p < 0.001$ ]. De acuerdo al análisis *post hoc*, en el grupo de la mezcla de ácidos grasos y diazepam el número de entradas al brazo abierto fue mayor ( $p < 0.05$ ) con respecto a los vehículos, ver figura 44b. Consistente con estos resultados, el análisis del porcentaje de entradas al brazo abierto (figura 44c) reveló un efecto significativo del tratamiento [ $F(3, 56) = 6.356, p < 0.001$ ]. Los grupos de la mezcla de ácidos grasos y diazepam tuvieron un mayor ( $p < 0.05$ ) porcentaje de entradas al brazo abierto con respecto a sus vehículos.

El análisis del número total de entradas a ambos brazos, el cerrado más el abierto, demostró un efecto significativo debido al tratamiento [ $F(3, 56) = 7.888, p < 0.001$ ], con un mayor número de entradas en el grupo de la mezcla de ácidos grasos respecto a todos los demás grupos ( $p < 0.05$ ), ver figura 44d.

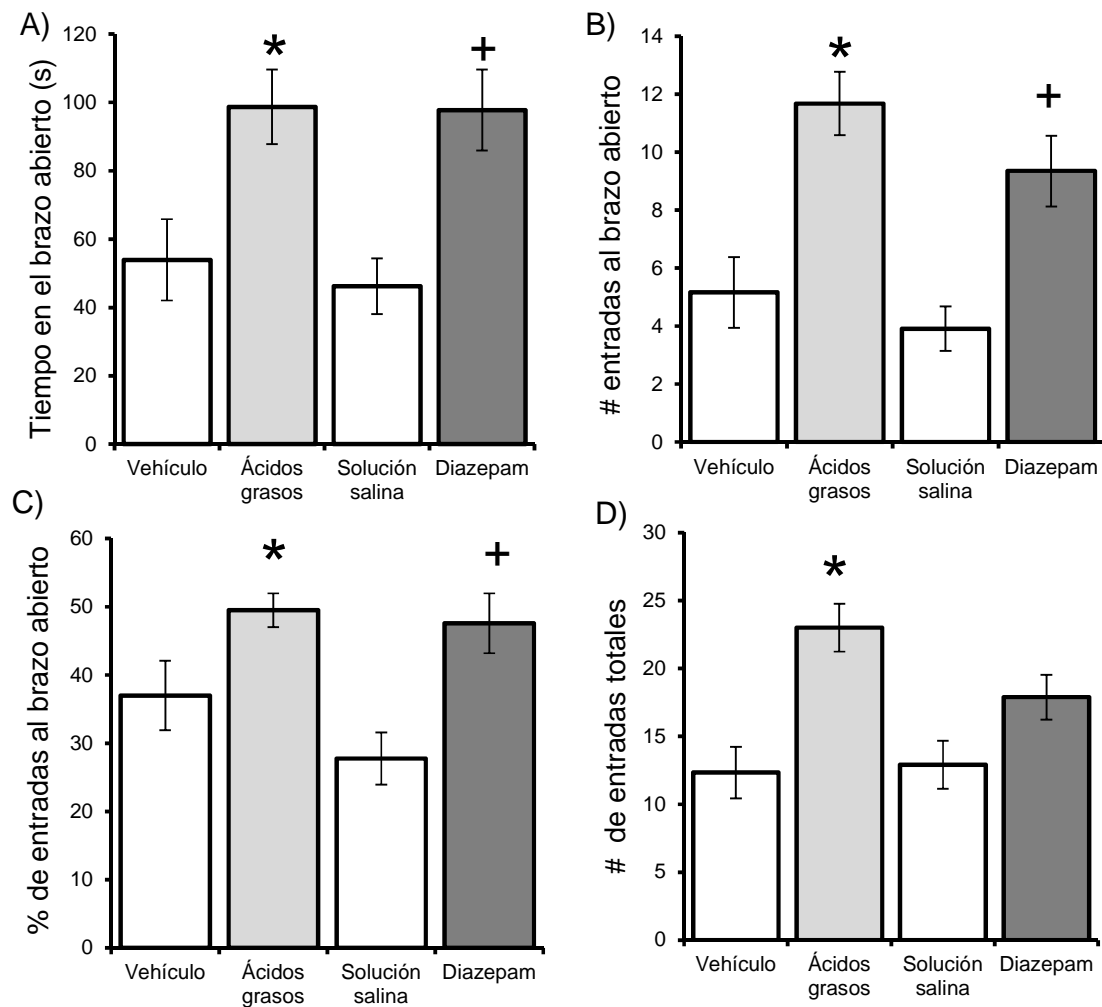


Figura 44. Variables de laberinto de brazos elevados. A) tiempo de permanencia en el brazo abierto, B) número de entradas al brazo abierto, C) porcentaje de entradas al brazo abierto, D) número de entradas totales. Los ácidos grasos disminuyeron las conductas indicadoras de ansiedad de manera semejante al diazepam (Student-Neuman-Keuls \* $p < 0.05$  vs vehículo, † $p < 0.05$  vs solución salina. El número de entradas totales aumentó únicamente en el grupo de ácidos grasos.

### 11.7.2 Conductas de evaluación del riesgo

Se encontraron diferencias significativas en la medición de las conductas de evaluación de riesgo como el tiempo de intentos de exploración [ $F(3, 56) = 5.889$ ,  $p < 0.001$ ] y el número de asomos al borde del brazo abierto [ $F(3, 56) = 5.971$ ,  $p < 0.001$ ], figura 45a y 45b. La prueba *post hoc* demostró que en el grupo de la mezcla de ácidos grasos y el grupo diazepam el tiempo de intentos de exploración fue menor ( $p < 0.05$ ), mientras que el número de asomos al brazo abierto fue mayor ( $p < 0.05$ ) respecto a los grupos tratados con vehículo.

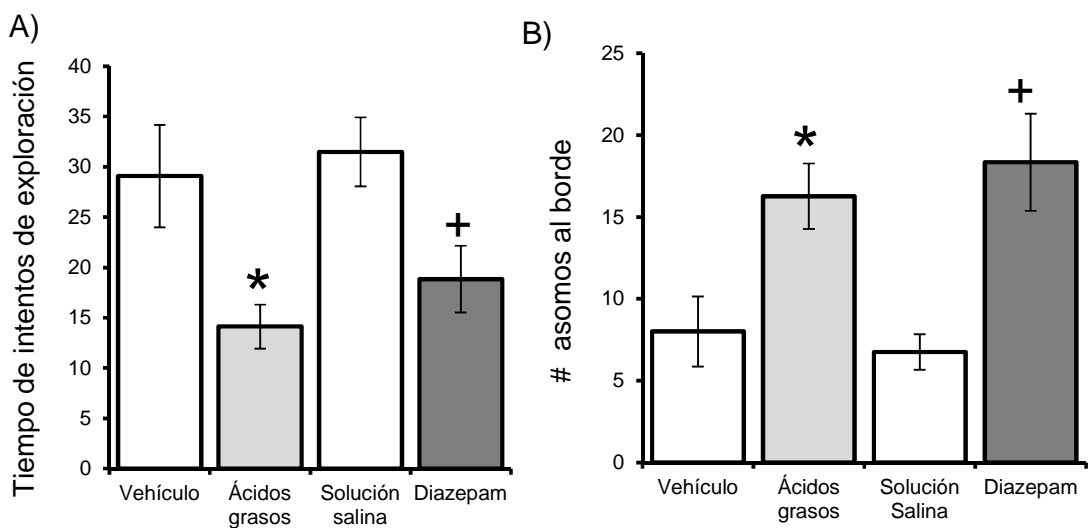


Figura 45. Variables evaluación del riesgo en el laberinto de brazos elevados. a) Tiempo de intentos de exploración, b) número de asomos al borde. Los ácidos grasos disminuyeron el tiempo de intentos de exploración y aumentaron el número de asomos al borde de manera semejante al diazepam (Student-Neuman-Keuls \* $p < 0.05$  vs vehículo, † $p < 0.05$  vs solución salina).

### 11.7.3 Prueba de actividad locomotriz

De acuerdo con el ANOVA de 1 vía para muestras independientes no se observaron diferencias significativas entre grupos ni en la locomoción [ $F(3, 56) = 0.0655$ ,  $p = 0.97$ ], ni en la distancia recorrida [ $F(3, 56) = 0.0571$ ,  $p = 0.982$ ], ni en el número de exploración vertical [ $F(3, 56) = 0.798$ ,  $p = 0.5$ ], ver tabla 6.

**Tabla 6. Variables de actividad locomotriz y exploración vertical.** No se encontraron diferencias significativas entre grupos para las variables de locomoción, Distancia y número de exploración vertical.

Variable	Vehículo	Ácidos grasos	Solución salina	Diazepam
Locomoción (n)	690.5 ± 73.8	722.5 ± 56.4	698.9 ± 32.8	722.9 ± 71.4
Distancia (m)	13.7 ± 1.9	14.3 ± 1.5	14.2 ± 1.2	14.3 ± 2.0
Exploración vertical (n)	20.0 ± 3.5	28.6 ± 4.5	24.5 ± 1.7	26.3 ± 3.8

## 12. Discusión

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el posible efecto ansiolítico y antidesesperanza de la administración de los ácidos grasos que forman parte del líquido amniótico humano al administrarlo en ratas en edad infantil y evaluar conductas indicadoras de desesperanza y ansiedad experimental en las pruebas de nado forzado, enterramiento defensivo, luz oscuridad y laberinto de brazos elevados.

En el experimento uno se comparó el tiempo de enterramiento de ratas infantiles en una caja rectangular utilizada en el modelo original contra el tiempo de enterramiento en la caja circular implementada en nuestro grupo de trabajo con el objetivo de aumentar el tiempo de enterramiento de las ratas infantiles. Debido al aumento en el enterramiento observado en la arena circular, en el experimento dos se ensayó el efecto de la administración diazepam (un ansiolítico clínicamente eficaz) sobre la conducta de enterramiento teniendo un mejor control de las variables tamaño y forma de la arena al comparar el efecto del tratamiento en la caja circular grande y chica; y la arena cuadrada del modelo típico (grande) y chica.

En resumen, los resultados del experimento uno y dos demostraron que la arena circular produce tiempos de enterramiento significativamente más largos con respecto a la arena rectangular utilizada en el modelo tradicional, además en la arena circular se observó claramente que la administración de diazepam produjo una disminución del tiempo de enterramiento, lo cual es interpretado como un efecto ansiolítico, por lo cual esta arena se utilizó para estudiar el efecto de los ácidos grasos en la prueba de enterramiento en un siguiente experimento.

El experimento 3 comparó el efecto de la administración de ácidos grasos contra el diazepam utilizando una batería conductual compuesta de la prueba de nado forzado, la prueba de actividad locomotriz, la prueba de enterramiento defensivo en la arena circular y la prueba de luz-oscuridad. Los resultados

demonstraron que la administración de ácidos grasos aumentó la latencia al enterramiento y redujo el tiempo de enterramiento en la arena circular de manera semejante al diazepam, además se observó una tendencia de los ácidos grasos a aumentar el tiempo de exploración en el compartimento iluminado en la prueba de luz oscuridad, estas tendencias concuerdan con un efecto ansiolítico. En cuanto a las variables indicadoras de desesperanza conductual en el nado forzado el efecto de los ácidos grasos fue aún más discreto, lo que sugiere que posiblemente estos no participen en la desesperanza conductual, no se observaron modificaciones en la actividad locomotriz. Por último en el experimento 4 se volvió a ensayar el efecto de los ácidos grasos esta vez utilizando únicamente el modelo de laberinto de brazos elevados para evitar efectos acumulados debido a la batería conductual y replicar el efecto ansiolítico de los ácidos grasos en otro modelo. En este último experimento observó un claro efecto ansiolítico de los ácidos grasos lo que concuerda con los hallazgos observados en la prueba de enterramiento.

El enterramiento defensivo se modifica a lo largo del desarrollo y durante las primeras semanas los tiempos de enterramiento son menores respecto a los tiempos que se observan en los adultos haciendo imposible probar fármacos cuyo efecto principal sea una reducción en los tiempos de enterramiento (Pinel et al., 1989; López-Rubalcava et al., 1996), estos autores utilizaron la arena del modelo original que consiste en una caja rectangular con dimensiones de 27x33x16 cm. Por lo tanto, para observar un efecto ansiolítico en la prueba de enterramiento defensivo, es decir una reducción en los tiempos de enterramiento y un aumento en la latencia, primero debió establecerse otro procedimiento que permitiera evaluar el tiempo de enterramiento en ratas intactas con una edad de 28 PN y evitar un efecto de piso ante administraciones farmacológicas de sustancias con potenciales efectos ansiolíticos. Con este fin en el presente trabajo se propuso el uso de una arena de enterramiento circular.

En el experimento 1 se llevó a cabo una comparación de la conducta de enterramiento de animales intactos utilizando la arena cuadrada comúnmente

usada en adultos y una arena circular más pequeña. Las variables evaluadas en la prueba de enterramiento, en ambas arenas fueron la latencia al enterramiento y la duración total de los periodos de enterramiento. Los resultados demostraron que en la caja rectangular del modelo original propuesto por Pinel y Treit (1978), los tiempos de enterramiento a los 21 días de edad son muy cortos en comparación con los tiempos que se observan en la edad adulta, edad en la cual se han realizado la mayoría de los trabajos presentes en la literatura (de Boer y Koolhaas, 2003), y que estos tiempos aumentan conforme avanza la edad, pues en el grupo en edad peripuberal (32-42 PN) el tiempo de enterramiento fue significativamente mayor con respecto a las ratas infantiles de 21 y 28 PN, por lo que la maduración en la conducta de enterramiento fue un fenómeno que se observó en este experimento y que ya ha sido previamente reportado utilizando la arena rectangular (Pinel et al., 1989; López-Rubalcava et al., 1996). Al comparar los tiempos de enterramiento de los tres grupos de la arena rectangular contra el grupo infantil de 28 días se demostró que el uso de la arena circular en este último grupo produjo una duración del enterramiento de al menos tres veces mayor con respecto a los grupos de la arena rectangular, pues con la arena circular la duración del enterramiento de los animales de 28 días de edad fue semejante a la que despliegan los adultos en la caja rectangular en estudios previos de nuestro grupo (Saavedra et al., 2006; Gutiérrez-García et al., 2009).

Respecto a la latencia, esta variable es un indicador de la reactividad del animal y se usa para medir el umbral de respuesta del animal ante el estímulo aversivo que se representa por el electrodo. Las latencias cortas son indicadores de una mayor reactividad y un estado tipo ansiedad, ya que los fármacos ansiolíticos aumentan la latencia al enterramiento del electrodo durante la prueba (de Boer y Koolhaas, 2003; Wilson et al., 2004). Respecto a los resultados de este trabajo, el grupo probado en la arena circular desplegó una menor latencia al enterramiento, aproximadamente la cuarta parte de la latencia observada en los grupos infantiles y la mitad de la que desplegó el grupo peripuberal (32-42 PN) en

la caja cuadrada; por lo tanto, la arena circular hace que los animales se encuentren más reactivos durante la prueba.

Estos resultados demuestran que una manipulación en las condiciones de la prueba que no afecte directamente en el animal puede influir en la conducta de enterramiento. Resulta muy interesante como es que el tiempo y la latencia al enterramiento varían al modificar la forma y tamaño de la arena sin aplicar ningún estresor adicional, lo que parece sugerir que aunque la prueba de enterramiento no depende de la experiencia previa del animal, puede ser modificada debido al contexto espacial. Un ejemplo semejante ocurre en ratas que han sido criadas en cajas con o sin una cama de aserrín como material de suelo. Se ha observado que las ratas previamente expuestas al aserrín durante el desarrollo postnatal despliegan una conducta de enterramiento defensivo mayor que las ratas que no fueron expuestas durante el desarrollo al mismo material del suelo (Pinel et al., 1989). En este sentido el uso de una caja circular aumenta la conducta de enterramiento de las ratas a los 28 días PN con respecto a ratas más jóvenes e incluso se alcanzan valores semejantes a los que se observan en ratas adultas en la arena rectangular.

En el experimento 2, se estudió el efecto farmacológico de un ansiolítico clínicamente eficaz en la prueba de enterramiento defensivo utilizando la arena circular y se comparó con el efecto en la arena cuadrada variando en ambas el tamaño de la arena para observar de manera separada la influencia de la forma y del tamaño sobre la conducta de enterramiento. Para esto se midió la latencia al enterramiento y la duración de enterramiento como indicadores de ansiedad. Además se incluyó el análisis de otras 4 conductas mutuamente excluyentes para aumentar el control en los resultados. Las conductas analizadas fueron el tiempo de acicalamiento, el tiempo de exploración vertical, el tiempo de inmovilidad y el resto de la actividad (ambulacion, masticamiento de la viruta, olfateos) se englobó y se analizó como tiempo de actividad inespecífica.

Los análisis utilizados permitieron discriminar el efecto del tamaño de la arena (área de su superficie) del de la forma de la misma (*El apéndice II muestra el manuscrito publicado en una revista especializada de circulación internacional*). El análisis reveló un aumento en el tiempo de enterramiento congruente con el experimento uno; sin embargo, el diazepam únicamente redujo el tiempo de enterramiento en la arena circular chica, lo que concuerda con su efecto ansiolítico característico reportado previamente en estudios con ratas adultas (Pinel y Treit, 1978; Barret, 1991; Rodríguez-Manzo, 1999). Un estudio previo utilizando la arena rectangular no reportó ninguna disminución en el enterramiento debida a manipulaciones farmacológicas semejantes (López-Rubalcava et al., 1996); el hecho de que este reportado que en la ratas los sistemas de neurotransmisión como el GABAérgico entre otros alcanzan su madurez alrededor de los 30 días (Hsu et al 2003; Fritschy et al., 2004; Bianchi et al., 2005) hace suponer que las manipulaciones farmacológicas carecen de efectos a nivel neuroquímico y por consecuencia conductual. Sin embargo, en animales aún más jóvenes (7 días de edad), se han reportado efectos ansiolíticos con fármacos como el diazepam, el aprazolam y otros compuestos con acción GABAérgica al medir vocalizaciones ultrasónicas como un indicador de ansiedad (Vivian et al., 1997), lo que hace suponer que la ausencia de un efecto ansiolítico en la caja de enterramiento rectangular es debida al desarrollo del repertorio conductual del animal en un ambiente determinado y que puede ser modificado por variaciones en el contexto de la prueba como lo demuestra el presente trabajo en el que fue posible observar un efecto típicamente ansiolítico en ratas infantiles de 28 días PN utilizando la arena circular.

Trabajos previos han reportado que las ratas y ratones entierran más el electrodo en las arenas más pequeñas, mientras que lo hacen menos entre más grande es la arena ya que una arena más grande le da al animal la opción de distanciarse del electrodo en vez de enterrar (Pinel et al., 1980; Maggio y Harder, 1983). Por lo cual nuestros resultados son consistentes con estudios previos en adultos. En nuestros resultados observamos que en las arenas chicas, tanto la



cuadrada como la circular, la latencia al enterramiento disminuye mientras que el tiempo de enterramiento aumenta con respecto a la arena cuadrada grande del modelo original. Algunas especies de roedores como el jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) no emiten la conducta de enterramiento defensivo en el modelo original con una arena cuadrada pero si lo hace en una arena circular. De acuerdo con los autores posiblemente esto se deba a que la presencia de esquinas en la arena, lo que le da al animal la oportunidad de emitir respuestas conductuales que interfieren con el enterramiento (Davis et al., 1982) ya que es un hecho que los roedores prefieren las esquinas y las paredes (Choleris et al., 2001). Esto concuerda con nuestros datos en donde observamos que la latencia disminuye en la arena circular grande con respecto a la arena cuadrada del modelo original a pesar de que ambas tienen la misma superficie. Es importante resaltar que aunque las tres modificaciones a la arena (círculo grande, cuadro chico y círculo chico) producen un aumento en el enterramiento en comparación a la arena del modelo original (cuadro grande), únicamente en la arena de círculo chico se observa un efecto ansiolítico significativo del diazepam.

Respecto a las otras variables analizadas, el acicalamiento y el tiempo de exploración vertical disminuyeron en las arenas modificadas sin efectos del tratamiento, lo cual puede ser interpretado como un efecto debido a que las cajas modificadas representan un mayor estresor y por lo tanto inhiben conductas autodirigidas y exploratorias las cuales fueron sustituidas por un aumento en el enterramiento. El tiempo de inmovilidad aumentó sólo en la arena de círculo chico, aunque también se observó que el diazepam aumentó la inmovilidad pero esto sólo ocurrió en los animales analizados en las arenas cuadro chico y círculo chico, este aumento de la inmovilidad no parece estar relacionado directamente con una disminución en el enterramiento, debido a que el grupo que recibió diazepam en la arena de cuadro chico no disminuyó el enterramiento a pesar de que si aumentó su inmovilidad. Existen reportes previos en los que se ha observado que el diazepam y el bretazenil (agonista parcial de sitio de unión a benzodiazepinas del receptor GABA<sub>A</sub>) disminuyen la locomoción o aumentan la inmovilidad

respectivamente, en la prueba de enterramiento defensivo en dosis muy por debajo de los efectos sedantes (Rohmer et al., 1990). Por último, conductas como la ambulación, mordisqueo de la viruta y olfateos se englobaron y se analizaron como tiempo de actividad inespecífica la cual disminuyó en las arenas pequeñas y no se vio afectada por el tratamiento, este efecto posiblemente esté relacionado con el aumento del enterramiento en el círculo chico.

El experimento tres evaluó el efecto de la administración de ácidos grasos en una batería de pruebas conductuales diseñadas para medir la desesperanza y la ansiedad experimental. En la prueba de nado forzado, los ácidos grasos parecen aumentar la distancia recorrida y el número de cuadrantes que el animal atraviesa sólo en el periodo de los primeros 5 minutos sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas. En cuanto al número y el tiempo de inmovilidad los ácidos grasos no producen efectos distinguibles del vehículo a lo largo de los tres periodos de la prueba, por lo tanto no es posible hablar de un efecto antidesesperanza típico como el que se observa con antidepresivos clínicamente eficaces (Porsolt et al, 1977; Rodríguez-Landa y Contreras, 2000; entre otros).

Por otro lado, el diazepam aumentó el número y el tiempo de inmovilidad conforme avanza el tiempo en la prueba de nado en un grado tal que al llegar al tercer periodo el número y el tiempo de inmovilidad son mayores que en el grupo vehículo y el grupo ácidos grasos. El efecto del diazepam en el nado forzado fue evaluado desde el inicio de este modelo sin que se observaran efectos en la inmovilidad con este ansiolítico en dosis de 0.5 - 4.0 mg/kg (Porsolt, 1977), posteriormente se ha replicado la ausencia de efecto del diazepam en el nado forzado en ratas (ver Borsini y Meli, 1988). Por otro lado, en las modificaciones a la prueba de nado, con una duración de 10 minutos divididos en dos periodos de 5 minutos, se ha observado que sólo una dosis alta de 5mg/kg de diazepam aumenta la inmovilidad en el nado durante los primeros 5 minutos mientras dosis más bajas no modifican la inmovilidad en este periodo, pero durante los siguientes

5 minutos, 1mg/Kg de diazepam es suficiente para aumentar la inmovilidad (Nishimura et al., 1989), este aumento en la inmovilidad también se ha observado en ratones con 1.25 mg/kg de diazepam (Nagatani et al., 1984) y con otros derivados de benzodiazepinas como el alprazolam (Nishimura y Tanaka, 1992). En el presente trabajo el efecto del diazepam sobre el número y tiempo de inmovilidad sólo es evidente en el tercer periodo de la prueba después de que los animales ya han nadado durante 10 minutos, esta característica en el efecto pro-inmovilidad del diazepam concuerda con estudios previos (Nishimura et al., 1989) y sugiere que en el aumento de la inmovilidad por el diazepam es posible la participación de un efecto sobre el sistema músculo esquelético, como relajante (Van der Meersch-Mougeot et al., 1993; Da-Rocha, 1997).

En la prueba de enterramiento defensivo, los ácidos grasos aumentaron el tiempo de latencia al enterramiento de manera semejante al diazepam mientras que disminuyeron el tiempo de enterramiento, es decir, ambas variables se modificaron en la dirección de un efecto ansiolítico semejante al diazepam, lo que parece indicar que la participación del receptor GABA (Ver figura 12.1 y apéndice III). En la prueba de luz oscuridad los ácidos grasos produjeron una mayor duración en el compartimento iluminado, pero sin alcanzar el criterio de significancia estadística, también es notable que el diazepam no parezca tener algún efecto, no se observaron diferencias estadísticas aunque las tendencias apuntan hacia un posible efecto ansiolítico. Los resultados sugieren que los ácidos grasos poseen propiedades ansiolíticas semejantes al diazepam.

En el experimento 4 se ensayó el efecto de los ácidos grasos en el modelo de laberinto de brazos elevados. El laberinto de brazos elevados es un modelo validado para medir efectos tipo ansiolíticos y ansiogénicos en ratas adultas (Walf y Frye, 2007), en esta prueba se exploran conductas innatas de la rata, su aversión a los espacios abiertos e iluminados y a la altura. Este modelo también se utiliza en roedores en etapas tempranas del desarrollo (Imhof et al., 1993; Estanislau y Morato, 2006; Lynn y Brown, 2010), dado que la aversión a los

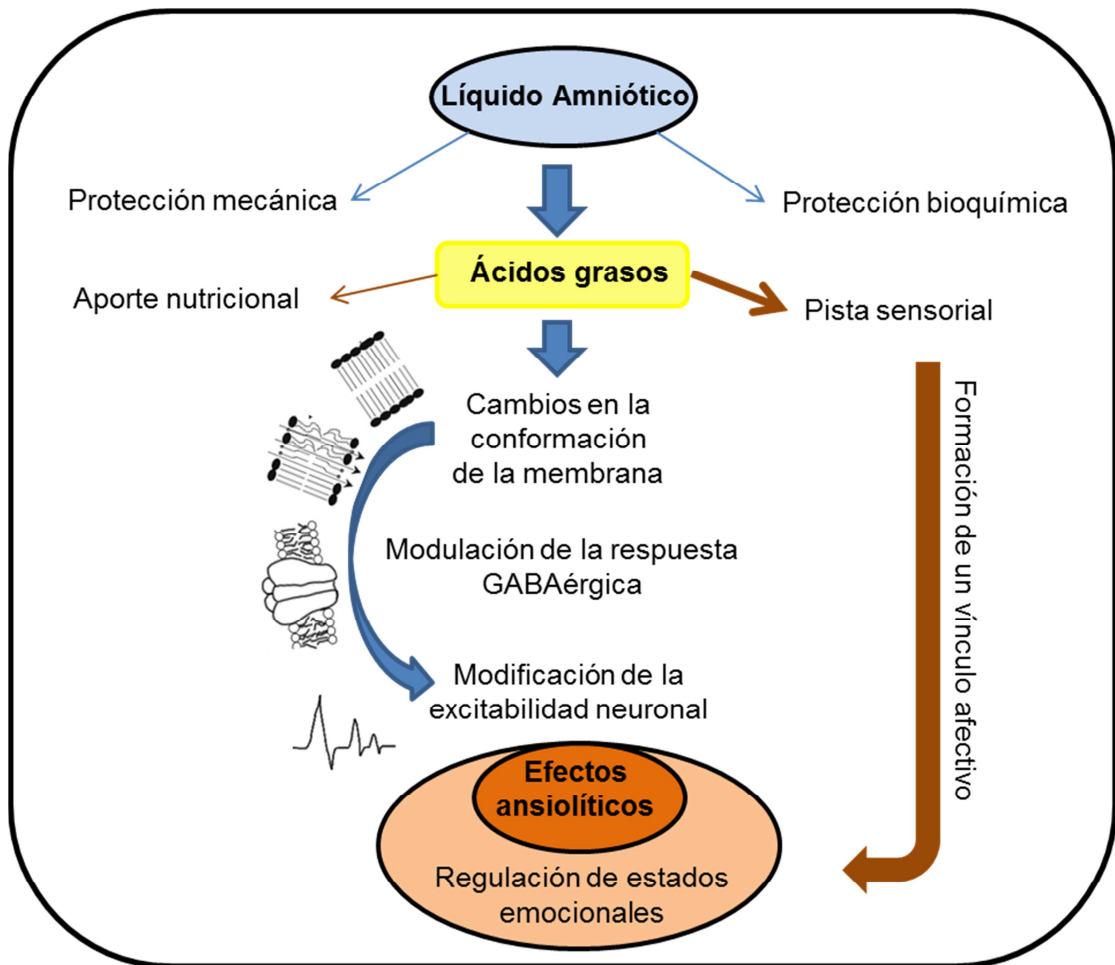
espacios abiertos e iluminados y a la altura también son típicos de roedores muy jóvenes (Imhof et al., 1993). Los ácidos grasos aumentaron la exploración en los brazos elevados de manera semejante al efecto observado en adultos (Contreras et al., 2011) los resultados se someterán a arbitraje para su publicación (ver apéndice IV). Las conductas de evaluación de riesgo también fueron medidas, únicamente el número de asomos al borde y el tiempo de intentos de exploración se modificó con el tratamiento de manera consistente con el efecto ansiolítico observado con las otras variables. Por lo tanto estas variables parecen ser sensibles en ratas infantiles, aunque su efecto no es tan marcado como el número y el tiempo de permanencia en el brazo abierto.

Finalmente, la prueba de actividad locomotriz se utilizó como un control de la actividad locomotriz del animal en los cuatro experimentos anteriores. Esta prueba ha sido utilizada en estudios de nuestro grupo de investigación y otros (Fernández-Guasti et al., 1992,1999; López-Rubalcava et al., 1994; Gutiérrez-García et al., 2009) para descartar la posibilidad de que los cambios en la conducta de enterramiento o en la inmovilidad durante el nado de los animales durante la prueba estén asociados a cambios de la actividad motora. En los experimentos realizados, el tratamiento con ácidos grasos o con diazepam no modificó el número de la locomoción, ni la distancia de la arena recorrida durante la prueba por lo que podemos descartar que las diferencias y tendencias observadas en las pruebas de ansiedad y desesperanza fueran ocasionadas por cambios en la actividad locomotriz de los animales. Respecto al número de exploraciones verticales, esta es una variable que ocasionalmente se mide junto con la deambulación y que se relaciona más con la exploración de un animal y puede ser usada como un indicador de ansiedad puesto que los animales más ansiosos dedican más tiempo a estar quietos y alertas ante el medio novedoso en vez de explorarlo activamente por lo que dedican menos tiempo a la exploración vertical. En el presente trabajo los grupos administrados con ácidos grasos o con diazepam no mostraron diferencias estadísticamente significativas en esta variable, lo que sugiere que únicamente la prueba de enterramiento y el laberinto

de brazos elevados son sensibles para estudiar el efecto ansiolítico en animales infantiles de 28 días de edad.

En resumen, los ácidos grasos poseen efectos ansiolíticos en ratas infantiles, el modelo teórico se representa en la figura 46. Ya que los ácidos grasos ensayados en este trabajo se encuentran presentes en el líquido amniótico, calostro y la leche materna (Mendoza-López et al., 2010, Contreras et al., 2011, 2013), y se han propuesto como una señal de reconocimiento (Contreras et al., 2012). Es posible que durante la lactancia estos mismos ácidos grasos presentes en la leche actúen como otro factor protector al estrés para las crías de la rata y otros mamíferos como el humano.

## 12.1 Modelo Teórico



**Figura 46.** Modelo teórico. Efecto de los ácidos grasos del líquido amniótico en la regulación de la ansiedad experimental. La administración de ácidos grasos produce un efecto tipo ansiolítico semejante al del diazepam en ratas de 28 días de edad. El líquido amniótico es un medio protector por excelencia del feto en desarrollo. Los ácidos grasos que contiene se encuentran presentes también en el calostro y la leche donde además de su papel nutricional, forman una pista olfativa que favorece la formación del vínculo entre la madre y sus crías el cual regula las respuestas emocionales de las crías. Además, estos ácidos grasos producen efectos apetitivos, relajantes y ansiolíticos en los mamíferos, probablemente al incrustarse en la doble capa lipídica de las membranas neuronales aumentando así su fluidez y modulando la actividad de los receptores incrustados en la membrana como el receptor GABA<sub>A</sub> implicado en la neurobiología de la ansiedad y las acciones farmacológicas de los ansiolíticos. Este proceso finalmente disminuye la actividad neuronal en regiones del sistema nervioso central que regulan las respuestas de ansiedad produciendo así su efecto ansiolítico.

### **13. CONCLUSIONES**

La arena circular es un modelo adecuado para la medición de ansiedad y efectos ansiolíticos en ratas infantiles.

Los ácidos grasos disminuyen las conductas indicadoras de ansiedad en la prueba de enterramiento defensivo y laberinto de brazos elevados de las ratas infantiles.

Los ácidos grasos carecen de acciones sobre la desesperanza evaluada en el modelo de nado forzado.

## 14. REFERENCIAS

Abbo, C., Kinyanda, E., Kizza, R.B., Levin, J., Ndyabangi, S. & Stein, D.J. (2013). Prevalence, comorbidity and predictors of anxiety disorders in children and adolescents in rural north-eastern Uganda. *Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health* 7:21.

Albers, E.M., Riksen-Walraven, M., Sweep, F.C.G.J. & Weerth, C. (2008). Maternal behavior predicts infant cortisol recovery from a mild everyday stressor. *The Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 49(1), 97-103.

Alonso, S.J., Castellano, M.A., Afonso, D. & Rodríguez, M. (1991). Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. *Physiology and Behavior*, 49, 69-72.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th edition, Text Revision (DSM-IV-TR). Washington, DC: American Psychiatric Association, 2000.

Bakshi, V.P. & Kalin, N.H. (2002). Animal models and endophenotypes of anxiety and stress disorders. En Davis, K.L., Charney, D., Coyle, J.T. & Nemeroff, C. (Ed). *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*. American college of neuropsychopharmacology, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, p. 883-900.

Baldwin, D.S., Evans, D.L., Hirschfeld, R.M. & Kasper, S. (2002). "Can we distinguish anxiety from depression?" *Psychopharmacology Bulletin*, 36(2): 158-65.

Barret, J.E. (1991). Animal behavior models in the analysis and understanding of anxiolytic drugs acting at serotonin receptors. En Oliver, B., Moss, J. & Slangen, J.L., (eds). *Animal models in Psychopharmacology*. *Advances in Pharmacological Sciences*. Birkhauser Verlag Basel. Germany, p. 137-155.

Beall, M.H., van den Wijngaard, J.P., van Gemert, M.J. & Ross, M.G. (2007). Regulation of amniotic fluid volume. *Placenta*, 28(8-9), 824-832. *Behavioural Brain Research*, 85(1), 27-35.

Beesdo, K., Knappe, S. & Pine, D.S. (2009). Anxiety and anxiety disorders in children and adolescents: developmental issues and implications for DSM-V. *Psychiatr Clin North Am* 32:483–524.

Bernardi, M., Genedanm, S., Tagliavini, S. & Bertolini, A. (1989). Effect of castration and testosterone in experimental models of depression in mice. *Behavioral Neuroscience*, 103 (3), 1148-1150.



- Bianchi, M.S., Lux-Lantos, V.A., Bettler, B. & Libertun, C. (2005). Expression of gamma-aminobutyric acid B receptor subunits in hypothalamus of male and female developing rats. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 160(2), 124-129.
- Bing, O., Heilig, M., Kakoulidis, P., Sundblad, C., Wiklund, L. & Eriksson, E. (1998). High doses of testosterone increase anticonflict behavior in rat. *European Neuropsychopharmacology*, 8(4), 321-323.
- Bitran, D., Dugan, M., Renda, P., Ellis, R. & Foley, M. (1999). Anxiolytic effects of the neuroactive steroid pregnanolone (3 alpha-OH-5 beta-pregnan-20-one) after microinjection in the dorsal hippocampus and lateral septum. *Brain Research*, 850(1-2), 217-224.
- Bitran, D., Kellogg, C.K. & Hilvers, R.J. (1993). Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABA<sub>A</sub> receptors in the rat. *Hormones and Behavior*, 27(4), 568-583.
- Bitran, D., Shiekh, M. & Mcleod, M. (1995). Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA<sub>A</sub> receptors. *Journal of Neuroendocrinology*, 7(3), 171-177.
- Borsini, F. & Meli, A. (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)*, 94(2), 147-60.
- Braw, Y., Malkesman, O., Dagan, M., Bercovich, A., Lavi-Avnon, Y., Schroeder M., et al. (2006). Anxiety-like behaviours in pre-pubertal rats of the Flinders Sensitive Line (FSL) and Wistar- Kyoto (WKY) animal models of depression. *Behavioral Brain Research*, 167, 261-269.
- Brunton, P.J., Russell, J.A. & Douglas, A.J. (2008). Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *Journal of Neuroendocrinology*, 20, 764-776.
- Cancela, L.M., Rossi, S. & Molina, V.A. (1991). Effect of different restraint schedules on the immobility in the forced swim test: modulation by an opiate mechanism. *Brain Research Bulletin*, 26(5), 671-675
- Champoux, M., Hwang, L., Lang, O. & Levine, S. (2001). Feeding demand conditions and plasma cortisol in socially-housed squirrel monkey mother-infant dyads. *Psychoneuroendocrinology*; 26: 461-477.
- Charmandari, E., Kino, T., Souvatzoglou, E. & Chrousos, G.P. (2003). "Pediatric stress: hormonal mediators and human development." *Hormone Research*, 59, 161-179.

Choleris, E., Thomas, A.W., Kavaliers, M. & Prato, F.S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(3), 235-260.

Codaccioni, X., Vaast, P., Therby, D., Baalbaky, I. & Puech, F. (1995). Physiologie du liquide amniotique. *Encycl.Méd.Chir (Elsevier, Paris-France), Gynécologie/Obstétrique 5006-A-10*, 15p.

Contreras, C.M., Gutiérrez-García, A.G., Bernal-Morales, B., Rodríguez-Landa, J.F., & López-Muñoz, D. (2008). Changes in lateral septal nucleus neuron firing rate and coping with forced swim during gestation in the Wistar rat. *Animal Behaviour*, 76(4), 1219-1225.

Contreras CM, Gutiérrez-García AG, Mendoza-López R, Rodríguez-Landa JF, Bernal-Morales B, Díaz-Marte C. (2013). Amniotic fluid elicits appetitive responses in human newborns: fatty acids and appetitive responses. *Developmental Psychobiology*; 55(3): 221-31.

Contreras, C.M., Lara-Morales, H., Molina-Hernández, M., Saavedra, M. & Arellín-Rosas, G. (1995). An early lesion of the lateral septal nuclei produces changes in the forced swim test depending on gender. *Progress of Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*; 19: 1277-1284.

Contreras, C.M., Molina, M., Saavedra, M. & Martínez-Mota, L. (2000). Lateral septal neuronal firing rate increased during proestrus-estrus in the rat. *Physiology and Behavior*, 68(3), 279-284.

Contreras, C.M., Rodríguez-Landa, J.F., Gutiérrez-García, A.G. & Bernal-Morales, B. (2001) The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurones in the rat. *Journal of Psychopharmacology*, 15(4), 231-6.

Contreras, C.M., Rodríguez-Landa, J.F., Gutiérrez-García, A.G., Mendoza-López, M.R., García-Ríos, R.I. & Cueto-Escobedo (2011) Anxiolytic like effects of human amniotic fluid and its fatty acids in Wistar rats. *Behavioral Pharmacology*, 22(7), 655-662.

Corpening, J.W., Doerr, J.C. & Kristal, M.B. (2000). Ingested bovine amniotic fluid enhances morphine antinociception in rats. *Physiology & Behavior*, 70, 15-18

Crawley, J. & Goodwin, F. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 13(2), 167-170.

Davis, S.F., Moore, S.A., Cowen, C.L. & Thurson, D.K. (1982). Defensive burying in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as a function of size and shape of the test chamber. *Animal learning & behavior*, 10(4), 516-520.

Da-Rocha, M.A. Jr., Puech, A.J. & Thiébot, M.H. (1997) Influence of anxiolytic drugs on the effects of specific serotonin reuptake inhibitors in the forced swimming test in mice. *Journal of Psychopharmacology*, 11(3), 211-8.

Darwin C. (1877). A biographical sketch of an infant. *Mind* 2(7), 285-294.

de Boer, S.F. & Koolhaas, J.M. (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 145-161.

Dhir, A. & Kulkarni, S.K. (2008). Antidepressant-like effect of 17beta-estradiol: involvement of dopaminergic, serotonergic, and (or) sigma-1 receptor systems. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86(10), 726-35.

du Bois, T.M., Deng, C., Bell, W. & Huang, X.F. (2006). Fatty acids differentially affect serotonin receptor and transporter binding in the rat brain. *Neuroscience*, 139(4), 1397-403.

El-Yassimi, A., Hichami, A., Besnard, P. & Khan, N.A. (2008). Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 12949-59.

Estanislau, C. & Morato, S. (2006). Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 24(4), 255-262.

Estrada-Camarena, E., Contreras, C.M., Saavedra, M., Luna-Baltazar, I. & López-Rubalcaba, C. (2002). Participation of the lateral septal nuclei (LSN) in the antidepressant-like actions of progesterone in the forced swimming test (FST). *Behavioral Brain Research*, 134(1-2), 175-83.

Feder, H.H. (1981). Estrous cyclicity in mammals. En: Adler, N.T. (Ed.), *Neuroendocrinology of Reproduction*. Plenum, New York, pp. 279– 348.

Fernández-Guasti, A., Hong, E. & López-Rubalcava, C. (1992). Species differences in the mechanism through which the serotonergic agonists indorenate and ipsapirone produces the anxiolytic action. *Psychopharmacology (Berlin)*, 107, 61–8.

Fernández-Guasti, A., Martínez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., Contreras, C.M. & López-Rubalcava, C. (1999). Chronic treatment with desipramine induces an

estrous cycle-dependent anxiolytic-like action in the burying behavior, but not in the plus-maze test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 63(1), 13-20.

Freeman, M.E. (1988). The ovarian cycle of the rat. En: Knobil, E., Neil, J. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 1893– 1928.

Fritschy, J.M., Sidler, C., Parpan, F., Gassmann, M., Kaupmann, K., Bettler, B. & Benke, D. (2004). Independent maturation of the GABA(B) receptor subunits GABA(B1) and GABA(B2) during postnatal development in rodent brain. *Journal of Comparative Neurology*, 477(3), 235-252.

Fröjd, A.S., Nissinen, S.E., Pelkonen, M.U., Marttunen, M.J., Koivisto, A.M. & Kaltiala-Heino, R. (2008). Depression and school performance in middle adolescent boys and girls. *Journal of Adolescence*, 31(4), 485-498.

Frye, C.A., Petralia, S.M. & Rhodes, M.E. (2000). Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety task coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha, 5alpha-THP. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 67(3), 587-596.

García-sáinz A. (2005). Metabolismo de lípidos. En: Drucker colín R (Ed). *Fisiología Medica* (pp. 475-482). México, México: Editorial Manual Moderno.

Gilad, V.H., Rabey, J.M., Eliyayev, Y. & Gilad, G.M. (2000). Different effects of acute neonatal stressors and long-term postnatal handling on stress-induced changes in behavior and in ornithine descarboxylase activity of adult rats. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 120, 255-259.

Gómez, G., Saldívar-González, J.A. & Rodríguez, R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: Una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25(1),14-24.

Guiraudie-Capraz, G., Slomianny, M.C., Pageat, P., Malosse, C., Cain, A.H., Orgeur, P. & Nagnan-Le Meillour, P. (2005). Biochemical and chemical supports for a transnatal olfactory continuity through sow maternal fluids. *Chemical Senses*, 30(3), 241-251.

Gunnar, M.R., Fisher, P.A. & Early Experience, Stress, and Prevention Network. (2006). Bringing basic research on early experience and stress neurobiology to bear on preventive interventions for neglected and maltreated children. *Development and Psychopathology*, 18(3), 651-677.

Gutiérrez-García, A.G., Contreras, C.M., Vásquez-Hernández, D.I., Molina-Jiménez, T., Jacome-Jacome, E. (2009). Testosterone reduces cumulative burying in female Wistar rats with minimal participation of estradiol. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 93(4), 406-12.

Hall, C.S. (1934). Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18, 385-403.

Heim, C. & Nemeroff, C.B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biological Psychiatry*, 49, 1023-1039.

Heim, C., Newport, D.J., Mletzko, T., Miller, A.H. & Nemeroff, C.B. (2008). The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6), 693-710.

Heller, A., Won, L., Bubula, N., Hessefort, S., Kurutz, J.W., Reddy, G.A. & Gross, M. (2005). Long-chain fatty acids increase cellular dopamine in an immortalized cell line (MN9D) derived from mouse mesencephalon. *Neuroscience Letters*, 376(1), 35-39.

Henderson, G., Fahey, T. & McGuire, W. (2007). Nutrient-enriched formula milk versus human breast milk for preterm infants following hospital discharge. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 17:CD004862.

Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y. Ostrander, M.M., Choi, D.C. & Cullinan, W.E. (2003). "Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness." *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(3), 151-180.

Hjern, A., Alfven, G. & Ostberg, B. (2008). School stressors, psychological complaints and psychosomatic pain. *Acta Paediatrica*, 97(1), 112-117.

Hsu, F.C., Zhang, G.J., Raol, Y.S., Valentino, R.J., Coulter, D.A. & Brooks-Kayal, A.R. (2003) Repeated neonatal handling with maternal separation permanently alters hippocampal GABAA receptors and behavioral stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 100(21),12213-8.

Imhof, J.T., Coelho, Z.M., Schmitt, M.L., Morato, G.S., Carobrez, A.P. (1993). Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behavioral Brain Research*, 56(2),177-180.

Jo, Y.H., Su, Y., Gutierrez-Juarez, R. & Chua, S. Jr. (2009) Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus. *Journal of Neurophysiology*, 101(5), 2305-2316.

Kanayama, N. (1994). Intrauterine defensive mechanism of amniotic fluid and fetal membranes. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 46(8), 673-685.

Kellog, C.K., Primus, R.J. & Bitran, D. (1991). Sexually dimorphic influence of prenatal exposure to diazepam on behavioral responses to environmental

challenge and on gamma-aminobutyric acid (GABA)-stimulated chloride uptake in the brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256(1), 259-265.

Kessler, R.C., Gruber, M., Hettema, J.M., Hwang, I., Sampson, N. & Yonkers, K.A. (2008). "Co-morbid major depression and generalized anxiety disorders in the National Comorbidity Survey follow-up." *Psychological Medicine*, 38(3): 365-74.

Kessler RC, Petukhova M, Sampson NA, Zaslavsky AM, Wittchen HU (2012). Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *International Journal of Methods in Psychiatric Research*, 21: 169–184.

Koss, W.A., Gehlert, D.R. & Shekhar, A. (2004). Different effects of subchronic doses of 17- $\beta$  estradiol in two ethologically based models of anxiety utilizing female rats. *Hormones and Behavior*, 46(2), 158-164.

Kristal, M.B. (1991). Enhancement of opioid-mediated analgesia: a solution to the enigma of placentophagia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 15(3), 425-35.

La Greca, A.M. & Harrison, H.M. (2005). Adolescent peer relations, friendships, and romantic relationships: do they predict social anxiety and depression? *Journal of Clinical Child and Adolescent Psychology*, 34(1), 49-61.

Lahmame, A. & Armario, A. (1996). Differential responsiveness of inbred strains of rats to antidepressants in the forced swimming test: are Wistar Kyoto rats an animal model of subsensitivity to antidepressants? *Psychopharmacology*, 123(2), 191-198.

Lahmame, A., del Arco, C., Pazos, A., Yritia, M. & Armario, A. (1997). Are Wistar-Kyoto rats a genetic animal model of depression resistant to antidepressants? *European Journal of Pharmacology*, 337(2-3), 115-123.

Lam, T.K., Schwartz, G.J. & Rossetti, L. (2005) Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nature Neuroscience*, 8, 579–584.

Levi, G., Sogos, C., Mazzei, E. & Paolesse, C. (2001). " Depressive disorder in preschool children: patterns of affective organization." *Child Psychiatry and Human Development*, 32(1): 55-69

Lévy, F., Poindron, P. & Le Neindre, P. (1983). Attraction and repulsion by amniotic fluids and their olfactory control in the ewe around parturition. *Physiology & Behavior*, 31, 687-692.

López, M., Tovar, S., Vázquez, M.J., Nogueiras, R., Senaris, R. & Dieguez, C. (2005). Sensing the fat: fatty acid metabolism in the hypothalamus and the melanocortin system. *Peptides*, 26, 1753–1758,

López-Rubalcava, C. & Fernández-Guasti, A. (1994). Noradrenaline–serotonin interactions in the anxiolytic effects of 5-HT<sub>1A</sub> agonists. *Behavioral Pharmacology*, 5, 42–51.

Lopez-Rubalcava, C., Fernandez-Guasti, A. & Urba-Holmgren, R. (1996). Age-dependent differences in the rat's conditioned defensive burying behavior: effect of 5-HT<sub>1A</sub> compounds. *Developmental Psychobiology*, 29(2), 157-69.

Lorenz K. *El anillo del Rey Salomón. Estudios de Psicología animal*. Barcelona, España: Editorial Labor S.A., 1962.

Lund, T.D., Rovis, T., Chung, W.C. & Handam, R.J. (2005). Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology*, 146(2), 797-807.

Lynn, D.A. & Brown, G.R. (2010). The ontogeny of anxiety-like behavior in rats from adolescence to adulthood. *Developmental Psychobiology*, 52(8):731-739.

Lyons, D.M., Martel, F.L., Levine, S., Risch, N.J. & Schatzberg, A.F. (1999) Postnatal experiences and genetic effects on squirrel monkey social affinities and emotional distress. *Hormones and Behavior*, 36, 266-275.

Maggio, J.C. & Harder, D.B. (1983). Genotype and environment interactively determine the magnitude, directionality, and abolition of defensive burying in mice. *Animal learning & behavior*, 11(2), 162-172.

Malhotra, S. & Dass, P.P. (2007). "Understanding childhood depression." *The Indian Journal of Medical Research*, 125: 115-128.

Malkesman, O., Braw, Y., Maayan, R., Weizman, A., Overstreet, D.H., Shabat-Simon, M. Et al. (2006). Two different putative genetic animal models of childhood depression. *Biological Psychiatry*, 59, 17-23.

Malkesman, O., Braw, Y., Zagoory-Sharon, O., Golan, O., Lavi-Avnon, Y., Schroeder, M. (2005). Reward and anxiety in genetic animal models of childhood depression. *Behavioral Brain Research*, 164, 1-10.

Marlier, L. & Schaal, B. (2005). Human newborns prefer human milk: conspecific milk odor is attractive without postnatal exposure. *Child Development*, 76(1),155-168.

Marlier, L., Schaal, B. & Soussignan, R. (1997). Orientation responses to biological odours in the human newborn: initial pattern and postnatal plasticity. *Comptes*

Rendus de l'Académie des Sciences. Série III, Sciences de la vie. 320(12), 999-1005.

Marlier, L., Schaal, B. & Soussignan, R. (1998). Bottle-fed neonates prefer an odor experienced in utero to an odor experienced postnatally in the feeding context. *Developmental Psychobiology*, 33, 133-45.

Martínez-Mota, L. & Fernández-Guasti, A. (2004). Testosterone-dependent antidepressant-like effect of noradrenergic but not of serotonergic drugs. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*; 78(4): 711-718.

Martínez-Mota, L., Contreras, C.M. & Saavedra, M. (1999). Progesterone reduces immobility in rats forced to swim. *Archives of Medical Research*, 30(4), 286-289.

Martínez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., López-Rubalcava, C., Contreras, C.M. & Fernández-Guasti, A. (2000). Interaction of desipramine with steroid hormones on experimental anxiety. *Psychoneuroendocrinology*, 25(2), 109-120.

Maslova, L.N., Bulygina, V.V., Markel, A.L. (2002) Chronic stress during prepubertal development: immediate and long-lasting effects on arterial blood pressure and anxiety-related behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 27. 549-561.

Matsumoto, M., Higuchi, K., Togashi, H., Koseki, H., Yamaguchi T, Kanno M, Et al. (2005). Early Postnatal Stress Alters the 5-HTergic Modulation to Emotional Stress at Postadolescent Periods of Rats. *Hippocampus*, 15, 775-81.

McElhaney, K.B., Antonishak, J. & Allen, J.P. (2008). "They like me, they like me not": popularity and adolescents' perceptions of acceptance predicting social functioning over time." *Child Development*, 79(3), 720-731.

McKinney, W.T. & Bunney, W.E. (1969). Animal model of depression: I. Review of evidence: implications for research. *Archives of General Psychiatry*, 21, 240-248.

Meaney, M.J. (2001). Maternal care, gene expression and the transmission of individual differences on stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1161-1192.

Mendoza-López, M.R., Contreras, C.M. Gutiérrez-García A.G. & Díaz-Marte Cynthia. (2010). ¿los ácidos grasos presentes en líquidos maternos participan en la comunicación materno-infantil? *Procesos Psicológicos y Sociales*, 6(1,2),

Mergl, R., Seidscheck, I., Allgaier, A.K., Möller, H.J., Hegerl, U. & Henkel, V. (2007). "Depressive, anxiety, and somatoform disorders in primary care: prevalence and recognition." *Depression and Anxiety*, 24(3): 185-95.

Merikangas KR, Zhang H, Avenevoli S, Acharyya S, Neuenschwander M, Angst J; Zurich Cohort Study. (2003). "Longitudinal Trajectories of Depression and Anxiety



in a Prospective Community Study: The Zurich Cohort Study." *Archives of General Psychiatry*, 60(10): 993-1000.

Miller, B., Sarantis, M., Traynelis, S.F. & Attwell, D. (1992). Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid, *Nature*, 355, 722–725

Moffitt, T.E., Harrington, H., Caspi, A., Kim-Cohen, J., Goldberg, D., Gregory, A.M. & Poulton, R. (2007). "Depression and generalized anxiety disorder: cumulative and sequential comorbidity in a birth cohort followed prospectively to age 32 years." *Archives of General Psychiatry*, 64(6): 651-60.

Morgan, K., Obici, S., Rossetti, L. (2004) Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 31139–31148.

Moriceau, S. & Sullivan, R.M. (2004). Unique neural circuitry for neonatal olfactory learning. *Journal of Neuroscience*, 24(5), 1182-9.

Moriceau, S. & Sullivan, R.M. (2005) Neurobiology of infant attachment. *Developmental psychobiology*, 47(3), 230-42.

Nagatani, T., Sugihara, T. & Kodaira, R. (1984). The effect of diazepam and of agents which change GABAergic functions in immobility in mice. *European Journal of Pharmacology*, 27, 97(3-4), 271-5.

Nakamura, J., Miwa, T., Sasaki, H., Shibasaki, J. & Kaneto, H. (1990). Effect of straight chain fatty acids on seizures induced by picrotoxin and pentylentetrazole in mice. *J Pharmacobio-dynamics*, 13(1), 76-81.

Nestler, E.J., Gould, E., Manji, H., Bucan, M., Duman, R.S., Gershenfeld, H.K. et al. (2002). Preclinical Models: status of basic research in depression. *Biological Psychiatry*, 52, 503–528.

Neumann, A., Hoey, R.F., Daigler, L.B., Thompson, A.C. & Kristal, M.B. (2009). Ingestion of amniotic fluid enhances the facilitative effect of VTA morphine on the onset of maternal behavior in virgin rats. *Brain Research* 19(1261), 29-36.

Nishimura, H. & Tanaka, M. (1992). Effects of alprazolam on anxiety-related behavior of rats in a modified forced-swim test employing straw suspension. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 41(2), 425-7.

Nishimura, H., Ida, Y., Tsuda, A. & Tanaka, M. (1989). Opposite effects of diazepam and beta-CCE on immobility and straw-climbing behavior of rats in a modified forced-swim test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 33(1), 227-231.

Nishitani, S., Miyamura, T., Tagawa, M., Sumi, M., Takase, R., Doi, H., Moriuchi, H. & Shinora, K. (2009). The calming effect of a maternal breast milk odor on the human newborn infant. *Neuroscience Research*, 63(1), 66-71.

NOM-062-ZOO-1999 (1999). Technical specifications for production, care and use of lab animals. Mexico: Sagarpa.

Nowak, R. & Poindron, P. (2006). From birth to colostrums: early steps leading to lamb survival *Reproduction Nutrition Development*, 46, 431–446

Nowak, R., Porter, R.H., Lévy, F., Orgeur, P. & Schaal, B., (2000). Role of mother–young interactions in the survival of offspring in domestic mammals. *Reviews of Reproduction*, 5(3), 153-163.

Nowak, R., Keller, M., Val-Laillet, D. & Lévy, F. (2007) Perinatal visceral events and brain mechanisms involved in the development of mother-young bonding in sheep. *Hormones and Behavior*, 52(1), 92-98.

Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G. & Rossetti, L. (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes*, 51, 271–275.

Ordway, R.W., Singer, J.J. & Walsh, J.V. Jr. (1991). Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosciences*. 14(3):96-100.

Overstreet, D.H. (1993). The flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17(1), 51-68.

Overstreet, D.H., Friedman, E., Mathé, A.A., & Yadid, G. (2005). The flinders sensitive line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 739-759.

Park, C.C. & Ahmed, Z. (1992). Alterations of plasma membrane fatty acid composition modify the kinetics of  $Na^+$  current in cultured rat diencephalic neurons. *Brain Research*, 570(1-2), 75-84.

Pearce, J. B. (1978). "The recognition of depressive disorder in children." *Journal of the royal society of medicine*, 71(7): 494-500.

Pellow, S. & File, S.E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24, 525-529.

Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. & 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, 149–67.

Pine, D.S., Cohen, P., Gurley, D., Brook, J. & Ma, Y. (1998). "The risk for early-adulthood anxiety and depressive disorders in adolescents with anxiety and depressive disorders." *Archives of general psychiatry*, 55(1): 56-64.

Pinel JP, Treit D, Ladak F, MacLennan AJ (1980). Conditioned defensive burying in rats free to escape. *Animal Learning and Behavior* 8:447–451.

Pinel, J.P. & Treit, D. (1978). Burying as a defensive response in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92, 708-712.

Pinel, J.P., Symons, L.A., Christensen, B.K. & Tees, R.C. (1989). Development of defensive burying in *Rattus norvegicus*: experience and defensive responses. *Journal of comparative psychology*, 103(4), 359-65.

Pinheiro Machado, F.L.C., Hurnik, J.F. & Burton, J.H. (1997). The effect of amniotic fluid ingestion on the nociception of cows. *Physiology and Behavior*, 62(6), 1339-1344.

Porsolt, R.D., Le Pichon, M. & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. *Nature*, 266(5604), 730-732.

Rodríguez-Landa, J.F. & Contreras, C.M. (2000). Los fármacos antidepresivos y la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado: Participación de los sistemas de neurotransmisión. *Archivos de Neurociencias*, 5(2), 74-83.

Rodríguez-Landa, J.F., Contreras, C.M., Bernal-Morales, B., Gutiérrez-García, A.G. & Saavedra, M. (2007). Allopregnanolone reduces the immobility in the forced swimming test and increases firing rate of lateral septal neurons through actions on GABAA receptor in the rat. *Journal of Psychopharmacology*, 21(1), 76-84.

Rodríguez-Manzo, G., López-Rubalcava, C. & Fernández-Guasti, A. (1999). Anxiolytic like effect of ejaculation under various sexual behavior conditions in the male rat. *Physiology & Behavior*, 67(5), 651-657.

Rohmer, J.P., Di Scala, G. & Sandner, P. (1990). Behavioral analysis of the effects of benzodiazepine receptor ligands in the conditioned burying paradigm. *Behavioural brain research* 38, 45-54.

Saavedra, M., Contreras, C.M., Azamar-Arizmendi, G. & Hernández-Lozano, M. (2006). Differential progesterone effects on defensive burying and forced swimming tests depending upon a gradual decrease or an abrupt suppression schedules. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 83, 130–135.

Schaal, B. & Marlier, L. (1998). Maternal and paternal perception of individual odor signatures in human amniotic fluid: potential role in early bonding. *Biology of the Neonate*, 74(4), 266-273.

- Schaal, B., Marlier, L. & Soussignan, R. (1995). Responsiveness to the odour of amniotic fluid in the human neonate. *Biology of the Neonate*, 67(6), 397-406.
- Schaal, B., Orgeur, P. & Marlier, L. (1994). Amniotic fluid odor in neonatal adaptation: a summary of recent research in mammals. *Advances in the Biosciences*, 93, 239-245.
- Schapiro, S. & Salas, M. (1970). Behavioral response of infant rats to maternal odor. *Physiology & Behavior*, 5, 815-817.
- Schmidt, W. (1992). The amniotic fluid compartment: the fetal habitat. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, 127, 1-100.
- Seligman, M.E.P. (1992). Emotional development and education. En: Atkinson, R.C., Lindzey, G. & Thompson R.F. Helplessness on depression, development and death (pp134-159). New York: W.H Freeman and company.
- Selye, H. (1936). "A syndrome produced by diverse nocuous agents." *Nature*, 138, 132.
- Selye, H. (1955). "Stress and disease." *Science*, 122(3171), 625-631.
- Shaal, B., Porter, B. & Porter, R.H. (1991). Microsmatic humans revisited: the generation and perception of chemical signals. In: Slater, P. (Ed). *Advances in The Study of Behavior* (pp.135-199). New York: Academic Press.
- Spector, A.A. (1999). Essentiality of fatty acids. *Lipids*, 34 (Suppl:S1-3), 51-53.
- Sullivan, M.R. (2003). Developing a Sense of Safety: The Neurobiology of Neonatal Attachment. *Annals of the New York Academy of Science*, 1008, 122–131.
- Sullivan, R.M. & Toubas P. (1998). Clinical usefulness of maternal odor in newborns: soothing and feeding preparatory responses. *Biology of neonate*, 74(6), 402-8.
- Svennerholm, L. & Vanier, M.T. (1978). Lipid and fatty acid composition of human cerebral myelin during development. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 100, 27-41.
- Svennerholm, L. (1968). Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *Journal of Lipid Research*, 9(5), 570-579.

Treit, D., Pinel, J.P. & Fibiger, H.C. (1981). Conditioned defensive burying: A new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 15(4), 619-626.

Uusi-Oukari, M. & Korpi, E.R. (2010). Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacological Reviews*, 62(1), 97-135.

Van der Meersch-Mougeot, V., da Rocha, M. Jr., Monier, C., Diquet, B., Puech, A.J. & Thiébot, M.H. (1993). Benzodiazepines reverse the anti-immobility effect of antidepressants in the forced swimming test in mice. *Neuropharmacology*, 32(5), 439-446.

van Oers, H.J.J., Kloet, E.R. & Levine, S. (1998). Early vs late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Developmental Brain Research*, 111, 245-252.

Varendi, H., Christensson, K., Porter, R.H. & Winberg, J. (1998). Soothing effect of amniotic fluid smell in newborn infants. *Early Human Development*, 51(1), 47-55.

Vivian, J.A., Barros, H.M., Manitiu, A. & Miczek, K.A. (1997). Ultrasonic vocalizations in rat pups: modulation at the gamma-aminobutyric acidA receptor complex and the neurosteroid recognition site. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282(1), 318-25.

Walf, A.A. & Frye, C.A. (2005). ER $\beta$ -selective estrogen receptor modulators produce antianxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats. *Neuropsychopharmacology*, 30(9), 1598-1609.

Walf, A.A. & Frye, C.A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, 2(2), 322-328.

Weiss, B. & Garber, J. (2003). "Developmental differences in the phenomenology of depression." *Development and Psychopathology*, 15(2): 403-430.

Williams, J.H., Errington, M.L., Lynch, M.A. & Bliss T.V.P. (1989). Arachidonic acid induces a long term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus, *Nature* 341, 739-742.

Wilson, M.A., Burghardt, P.R., Ford, K.A., Wilkinson, M.B. & Primeaux, S.D. (2004). Anxiolytic effects of diazepam and ethanol in two behavioral models: comparison of males and females. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 78(3), 445-58.

Yang, K. (1997). Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: barrier to maternal glucocorticoids. *Reviews of Reproduction*, 2(3), 129-132.

Yoshihara, T. & Yawaka, Y. (2008). Repeated immobilization stress in the early postnatal period increases stress responses in adults. *Physiology and Behavior*, 93 (1-2), 322-326.

## APÉNDICE I

Contreras, C.M., Rodríguez-Landa, J.F., Gutiérrez-García, A.G., Mendoza-López, M.R., García-Ríos, R.I. & Cueto-Escobedo J. (2011). Anxiolytic-like effects of human amniotic fluid and its fatty acids in Wistar rats. *Behavioural Pharmacology*, 22 (7), 655-662.

# Anxiolytic-like effects of human amniotic fluid and its fatty acids in wistar rats

Carlos M. Contreras<sup>a,b</sup>, Juan Francisco Rodríguez-Landa<sup>b</sup>, Ana G. Gutiérrez-García<sup>b,c</sup>, M. Remedios Mendoza-López<sup>d</sup>, Rosa Isela García-Ríos<sup>b</sup> and Jonathan Cueto-Escobedo<sup>b</sup>

Odors from amniotic fluid produce signs of calmness in mammals suggesting some anxiolytic-like properties. Experimental models, such as the defensive burying, elevated plus maze, and open field tests offer well-controlled approaches to the study of putative anxiolytic substances using rats. Using gas chromatography–mass spectrometry, we first identified eight fatty acids (lauric, myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, elaidic, and linoleic acids) as consistently present in human amniotic fluid. We then used the defensive burying and elevated plus maze tests to compare the action of diazepam (2 mg/kg), fresh amniotic fluid, and a mixture of its fatty acids with two vehicles (i.e. propylene glycol and centrifuged amniotic fluid with a low fatty acid content). No significant differences in estradiol or progesterone content were found between fresh amniotic fluid and centrifuged amniotic fluid using the microparticle enzyme immunoassay. Compared with the vehicle, diazepam, fresh amniotic fluid, and the fatty acid mixture increased burying latency, reduced cumulative

burying, and increased the time spent in the open arms of the elevated plus maze in both sexes without altering general locomotor activity. We conclude that the fatty acids contained in human amniotic fluid exert anxiolytic-like effects, with minimal or no participation of female gonadal steroids. *Behavioural Pharmacology* 22:655–662 © 2011 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

*Behavioural Pharmacology* 2011, 22:655–662

**Keywords:** anxiety, anxiolytic, defensive burying test, elevated plus maze, fatty acids, human amniotic fluid, rat

<sup>a</sup>Unidad Periférica Xalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, <sup>b</sup>Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, <sup>c</sup>Facultad de Psicología and <sup>d</sup>Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA), Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

Correspondence to Dr Carlos M. Contreras, Dr Sc, Laboratorio de Neurofarmacología, Av. Dr. Luis Castelazo s/n, Col. Industrial Las Ánimas, Xalapa 91190, Veracruz, México  
E-mail: ccontreras@uv.mx

Received 29 November 2010 Accepted as revised 11 May 2011

## Introduction

Exposure of human newborns to amniotic fluid odors decreases grimaces and crying when their mothers are absent (Schaal and Marlier, 1998). Indeed, newborns from other species also appear to be calmed when they are exposed to amniotic fluid odors (Schapiro and Salas, 1970), suggesting the possible effects of amniotic fluid on emotion and anxiety (Contreras and Gutiérrez-García, 2010). In pigs (*Sus scrofa*, Large White breed), a possible appeasing maternal pheromone composed of six fatty acids (capric acid, lauric acid, myristic acid, palmitic acid, oleic acid, and linoleic acid) is present in amniotic fluid, colostrum, and maternal milk (Pageat, 2001). A similar mixture of fatty acids has been shown to exert anxiolytic effects in children, although these effects were anecdotal (Pageat, 2001). Among many other substances, amniotic fluid also contains progesterone and estradiol (Atkinson *et al.*, 1996), two steroids that exert anxiolytic-like effects in validated experimental animal models of anxiety (Aikey *et al.*, 2002; Walf and Frye, 2008; Coban *et al.*, 2009). For example, in the defensive burying test, progesterone significantly reduced cumulative burying (Picazo and Fernández-Guasti, 1985), suggesting an anxiolytic-like effect. In addition, conjugated equine

estrogens produced anxiolytic-like effects in rats (i.e. increased the time spent on the open arms of the elevated plus maze; Walf and Frye, 2008). In fact, 17 $\beta$ -estradiol and other estradiol receptor modulators significantly increased the time spent on the open arms of the elevated plus maze and time spent in the white compartment of the light–dark transfer task (Walf and Frye, 2005).

Porcine amniotic fluid contains some fatty acids that seemingly prepare newborns for the transition from intrauterine life to the postnatal environment (Guiraudie-Capraz *et al.*, 2005), but no studies, of which we are aware, have confirmed the anxiolytic-like effects of amniotic fluid using well-accepted, experimental animal models that are typically used to test the clinical effectiveness of anxiolytics, such as the defensive burying test (Pinel and Treit, 1978; Treit, 1985a) and elevated plus maze (Griebel *et al.*, 1997; Varty *et al.*, 2002). These tests are usually conducted together with the evaluation of general locomotor activity in the open field test (Fernández-Guasti and Picazo, 1992). Diazepam is commonly used as a control agent (Griebel *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2004). A substance, when tested in rodents, is considered a



putative human anxiolytic if it reduces burying in the defensive burying test (Treit, 1985a), increases the time spent in the open arms of the elevated plus maze (Pellow *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 2004), and does not modify general locomotor activity, therefore excluding possible sedative effects (Treit, 1985b).

Therefore, we obtained human amniotic fluid and tested its anxiolytic-like effects in Wistar rats in an attempt to achieve a commonly used experimental design for testing anxiolytic compounds in rodents. We hypothesized that the anxiolytic-like effects of human amniotic fluid may be related to its gonadal steroid or fatty acid content. We obtained human amniotic fluid from healthy women during delivery and used gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) to detect fatty acids and the microparticle enzyme immunoassay to analyze the hormonal profile (i.e. estradiol and progesterone) of fresh and centrifuged human amniotic fluid. After determining the fatty acid content that consistently occurred in amniotic fluid, we prepared a mixture of these fatty acids at the same concentrations as observed in the human amniotic fluid. We injected the fluids into different groups of female and male Wistar rats and subjected them to the defensive burying, elevated plus maze, and open field tests.

## Methods

### Ethics

For the human samples, we strictly followed international principles of confidentiality and healthcare, such as the Declaration of Helsinki, and all rat procedures followed the principles of animal care based on the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1985). Both protocols received authorization from the Biomedical Research Institute Ethical Committee (Universidad Nacional Autónoma de México).

### Human samples

A sample of approximately 80 ml of amniotic fluid was collected from 15 healthy women during normal delivery or cesarean section. Only the amniotic fluid obtained from women completely devoid of any pathology was included in the study. After collection of the amniotic fluid, half of the samples were filtrated (fresh amniotic fluid) with filter paper (No. 4, 110 mm diameter; Whatman International Ltd, Maidstone, England). The other half was further centrifuged at 3500 rpm for 10 min (Centrifuge Model J-600, Solbat, Mexico, D.F. Mexico). Both samples were tested for their fatty acid content using GC–MS.

For the chemical identification of fatty acids, each amniotic fluid sample was lyophilized. Hydrolysis was performed at 80°C for 15 min with constant stirring. Fatty acid methyl esters were prepared following a method modified from Egan *et al.* (1981). The identification of components was based on a National Institute of

Standards and Technology Mass Spectra Library Search, and the spectra and retention times were compared with standards (Fatty acid methyl esters mix, C8:C22, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). The amounts of fatty acids were calculated from the areas under peaks and estimated using standards.

The hormonal profiles from fresh and centrifuged amniotic fluid were determined by automated microparticle enzyme immunoassay (Valdes and Jortani, 2002) with an AxSYM system (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA) and commercially available kits (estradiol: 7A63, 34-3205/R6; progesterone: 7A64, 46-6866/R8).

### Preparation of fatty acid mixture

According to the fatty acid content detected in human amniotic fluid by GC–MS, we prepared a mixture of the most consistently detected fatty acids (all analytical grade fatty acids; Sigma-Aldrich). For preparation of the mixture, we used the percentage of content on the basis of the GC–MS results, which consisted of lauric acid (0.4 mg), myristic acid (3.0 mg), palmitic acid (15.3 mg), palmitoleic acid (7.1 mg), stearic acid (3.7 mg), oleic acid (8.0 mg), elaidic acid (1.5 mg), and linoleic acid (4.4 mg) in 100 ml of vehicle (96% propylene glycol and 4% ethanol) at a temperature of less than 40°C. The test included two control vehicles. The first control was propylene glycol (analytical grade, J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de Mex, Mexico) as the vehicle for the fatty acid mixture. The second control was amniotic fluid centrifuged at 3500 rpm for 10 min in a Sol-Bat J-600 centrifuge (Veracruz, Mexico). The upper portion of centrifuged amniotic fluid was collected with a pipette, and its fatty acid content was measured by GC–MS. This second control vehicle was prepared from half of the previously obtained amniotic fluid sample.

### Subjects

Rats were obtained from a local strain initially supplied by Harlan Co (Mexico city, Mexico). They were housed in local housing facilities at a mean temperature of 25°C with a 12 h/12 h light/dark cycle, with lights on at 7:00 a.m. All subjects included in the study were 2 months old, weighed 200–250 g, and were housed five to six rats per cage in acrylic boxes (44 cm width × 33 cm length × 20 cm height) with free access to food (Teklad lab animal diets, Harlan Co.) and purified water. The experimental groups consisted of 99 male and 91 female Wistar rats in diestrus. The estrous phase of the females was considered because of the well-documented estrous cycle-dependent differences in performance in behavioral tests (Fernández-Guasti and Picazo, 1992; Martínez-Mota *et al.*, 2000; Walf and Frye, 2008, 2010). Vaginal smears were observed on an optical microscope (Nikon, Tokyo Japan Optiphot-2, 40 × magnification), following the criteria of Rhodes *et al.* (2002). Diestrus reflected a predominately large number

of leukocytes, some nucleated cells, and almost no cornified cells. All experiments were performed during the light period (approximately 12:00 p.m.).

## Behavioral tests

### Defensive burying test

Rats were assigned to six experimental groups: (a) centrifuged human amniotic fluid (female,  $n = 10$ ; male,  $n = 8$ ), (b) fresh human amniotic fluid (female,  $n = 9$ ; male,  $n = 8$ ), (c) propylene glycol (96%) and absolute alcohol (4%) as the vehicle for the fatty acid mixture (female,  $n = 9$ ; male,  $n = 8$ ), and (d) mixture of eight fatty acids present in human amniotic fluid (female,  $n = 9$ ; male,  $n = 9$ ). We detected a strong similarity in the composition of the human amniotic fluid among parturients; therefore, pooled centrifuged or fresh amniotic fluid was injected. All injections in these groups were performed subcutaneously in a volume of 1.0 ml/rat, 1 h before the behavioral tests. A fifth group (female,  $n = 8$ ; male,  $n = 8$ ) was injected with diazepam (2.0 mg/kg, intraperitoneally; Hoffman-Roche, Basel, Switzerland, dissolved in propylene glycol 40% and injected in a volume of 2.0 ml/kg) 1 h before the behavioral tests. A sixth group (female,  $n = 8$ ; male,  $n = 8$ ) was injected with saline (0.9% NaCl, intraperitoneally).

An acrylic box ( $27 \times 17.5 \times 15.5$  cm) with the floor covered by a 5 cm bed of fine sawdust was used. From one of the walls of the box ( $17.7 \times 15.5$  cm), an electrode (7 cm length, 0.5 cm diameter) protruded horizontally 2 cm above the sawdust bed (Pinel and Treit, 1978; Treit, 1985a). The electrode delivered a constant-intensity current (0.3 mA, direct current) through an electronic stimulator (Grass Instruments S44, Quincy, Massachusetts, USA) coupled in series to a stimulus isolation unit (Grass Instruments SIU5) and a constant-current unit (Grass Instruments CCUIA). Immediately after placing the subject in the box, the latency to bury the probe and total time spent burying for 10 min was evaluated.

### Elevated plus maze

Another set of rats was assigned to six experimental groups with similar treatments similar to the defensive burying test: (a) centrifuged human amniotic fluid (female,  $n = 6$ ; male,  $n = 12$ ), (b) fresh human amniotic fluid (female,  $n = 8$ ; male,  $n = 8$ ), (c) vehicle for the mixture of fatty acids (female,  $n = 6$ ; male,  $n = 8$ ), (d) mixture of eight fatty acids present in human amniotic fluid (female,  $n = 6$ ; male,  $n = 6$ ), (e) 2.0 mg/kg diazepam (female,  $n = 6$ ; male,  $n = 6$ ), and (f) saline solution (female,  $n = 6$ ; male,  $n = 10$ ). All injections were performed subcutaneously in a volume of 1.0 ml/rat, 1 h before the behavioral tests, with the exception that diazepam and its vehicle were administered intraperitoneally.

The elevated plus maze was constructed of wood and situated in a brightly lit room. The apparatus consisted of two opposite open and closed arms set in a plus

configuration. The open and closed arms were painted white and black, respectively. The dimensions of the open arms were  $50 \times 10$  cm (length  $\times$  width), and the closed arms were  $50 \times 10 \times 40$  cm (length  $\times$  width  $\times$  height). The entire maze was elevated 50 cm from the floor. The rats were placed at the center of the maze, facing an open arm, and the time spent on and number of entries into the open arms were recorded (Walf and Frye, 2007). The total number of entries (open arms + closed arms) was also recorded, and the percentage of open arm entries [(open entries)/(total entries)  $\times$  100] was calculated. Rats that fell to the floor were discarded from subsequent data analysis. In the same 5 min test, we evaluated two risk assessment measures according to Griebel *et al.* (1996) (a) attempts [attempt at entry into open arms followed by avoidance responses, including stretch attend posture (i.e. the rat stretches forward and retracts to its original position)] and (b) head-dipping (protruding the head over the ledge of an open arm and down toward the floor; this response can occur while the subject's body is in the closed arms, central square, or open arms). For these behaviors, the number of events and time spent engaging in these behaviors were evaluated.

### Open field test

To evaluate the effect of treatments on spontaneous locomotor activity and discard the possibility of hypoactivity or hyperactivity, which could interfere with performance in the defensive burying test and elevated plus maze, a 5 min open field test was performed after the elevated plus maze test in another room under red light illumination. The rats were placed in the room 30 min before locomotor activity testing.

We used an automated locomotor activity monitor (Acti-Track v2.7.10, PanLab, S.L., Instrument, Barcelona, Spain) constructed of an acrylic box ( $45 \times 45$  cm) with 35 cm high walls, 3 cm above the box frame floor ( $45 \times 45$  cm). A total of 32 infrared beams, 16 each on perpendicular walls, were mounted on the walls of the box and connected to an interface (LE 8811, LSI Leticia Scientific Instrument, Barcelona, Spain) and subsequently to a computer. For data analysis, the cage was divided into eight equally sized squares, and we measured the number of entries into each square, distance traveled, and total resting time during the 5 min test as indicators of locomotion. No other behaviors, such as rearing or sniffing, were evaluated. Because of the relatively small cage, we did not compare central against peripheral exploration.

After each experimental session, the defensive burying cage, elevated plus maze, and open field box were carefully cleaned and deodorized with a cleaning solution (0.5% ammonia, 15% ethanol, 10% extran, 5% isopropyl alcohol, 19% Pinol, and 50.5% water). Five minutes elapsed between each test to allow the scent of the substances to disperse.

## Statistical analysis

As the assay data followed homogeneity of variance and a normal distribution, we used Student's *t*-test to compare the hormonal content among fresh and centrifuged human amniotic fluid. The behavioral variables were analyzed using two-way analysis of variance, with the first factor sex and the second factor treatment. When values of *P* less than 0.05 were revealed by the analysis of variance, the Student–Newman–Keuls post-hoc test was applied. The results are expressed as mean ± SE. Values of *P* 0.05 or less were considered statistically significant.

## Results

### Fatty acid content in human amniotic fluid

We found 15 fatty acids present in the human amniotic fluid samples (Table 1), but only eight were consistently found in measurable quantities.

In the analysis of the content of these eight fatty acids in fresh and centrifuged amniotic fluid, we found significant differences between groups [ $F(1,112) = 63.79$ ,  $P < 0.001$ ] and fatty acids [ $F(7,112) = 5.58$ ,  $P < 0.001$ ] and a significant interaction between the factors [ $F(7,112) = 5.03$ ,  $P < 0.001$ ]. The post-hoc test showed that the significant differences were attributable to the fresh amniotic fluid because the centrifuged amniotic fluid, in addition to having a very low fatty acid content (approximately 1%), represented a blunted proportion of fatty acids (Table 2).

### Hormonal profiles

The differences in estradiol ( $t_{14} = -0.19$ , NS) and progesterone ( $t_{14} = -0.07$ , NS) content between fresh and centrifuged human amniotic fluid did not reach statistical significance and fell within plasmatic physiological ranges (Table 2).

### Behavioral tests

#### Defensive burying test

Burying latency was significantly different between sexes [ $F(1,90) = 6.62$ ,  $P < 0.01$ ], and the burying latency was longer in males ( $229.4 \pm 32.96$  s) than females ( $139.8 \pm$

**Table 1 Fatty acid content in human amniotic fluid**

Fatty acid	Fatty acid content (µg/ml)	Percentage of amniotic fluid
C10:0 (capric acid)	2.21	0.1
C12:0 (lauric acid)	7.23	0.3
C14:0 (myristic acid)	54.43	2.0
C16:0 (palmitic acid)	752.59	27.4
C16:1 (palmitoleic acid)	90.74	3.3
C18:0 (stearic acid)	134.09	3.0
C18:1 <i>cis</i> (oleic acid)	639.06	23.3
C18:1 <i>trans</i> (elaidic acid)	70.90	2.6
C18:2 (linoleic acid)	766.41	27.9
C18:3 (linolenic acid)	17.97	0.7
C20:0 (arachidic acid)	10.41	0.4
C20:1 (eic acid)	14.32	0.5
C20:4 (arachidonic acid)	134.31	4.9
C22:0 (behenic acid)	12.54	0.5
Docosahexaenoic acid	35.90	1.3

**Table 2 Fatty acid and hormonal steroid content in fresh and centrifuged human amniotic fluid**

Fatty acid	Fresh human amniotic fluid (µg/ml)	Centrifuged human amniotic fluid (µg/ml)
C12:0 (lauric acid)	3.57	0.30
C14:0 (myristic acid)	26.22	0.28
C16:0 (palmitic acid)	117.08	3.10*
C16:1 (palmitoleic acid)	66.78	0.16*
C18:0 (stearic acid)	33.27	0.86*
C18:1 <i>cis</i> (oleic acid)	78.48	2.05*
C18:1 <i>trans</i> (elaidic acid)	13.24	0.06
C18:2 (linoleic acid)	38.95	0.30*
Steroidal hormones	Fresh human amniotic fluid (pg/ml)	Centrifuged human amniotic fluid (pg/ml)
Estradiol	3755.113 ± 564.245	3905.075 ± 575.067
Progesterone	137.000 ± 26.308	139.550 ± 26.375

\* $P < 0.05$ , compared with fresh human amniotic fluid.

21.46 s). The treatment factor also reached significance [ $F(5,90) = 4.64$ ,  $P < 0.001$ ]. The post-hoc test showed that burying latency was longer ( $P < 0.05$ ) in the diazepam ( $304.5 \pm 57.13$  s), fatty acid mixture ( $255.1 \pm 54.86$  s), and fresh human amniotic fluid ( $232.1 \pm 59.92$ ) groups than in the vehicle groups (saline:  $138.5 \pm 45.78$ ; centrifuged human amniotic fluid:  $98.8 \pm 18.92$ ; fatty acid mixture vehicle:  $78.6 \pm 14.70$ ). The interaction between factors was also significant [ $F(5,90) = 2.39$ ,  $P < 0.05$ ], indicating that the fatty acid mixture and fresh human amniotic fluid increased ( $P < 0.05$ ) burying latency in males but not females.

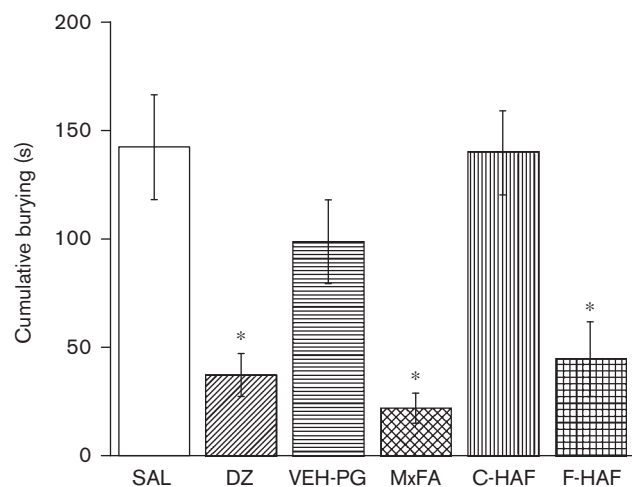
Cumulative burying did not differ between sexes [ $F(1,90) = 0.049$ , NS] but was significantly different between treatments [ $F(5,90) = 10.02$ ,  $P < 0.001$ ]. Diazepam, the fatty acid mixture, and fresh human amniotic fluid similarly reduced cumulative burying compared with centrifuged amniotic fluid and the fatty acid vehicle. No significant interaction was found between factors [ $F(5,90) = 1.45$ , NS; Fig. 1].

#### Elevated plus maze

No differences were found between sexes ( $[F(1,76) = 0.43$ , NS] in the time spent on the open arms; however, the treatments significantly affected the time spent on the open arms [ $F(5,76) = 8.63$ ,  $P < 0.001$ ]. The post-hoc test showed that the time spent on the open arms was longer ( $P < 0.05$ ) in the diazepam, fatty acid mixture, and fresh human amniotic fluid groups than in the vehicle groups (centrifuged human amniotic fluid and fatty acid mixture vehicle). No significant interaction was found between factors [ $F(5,76) = 0.87$ , NS; Fig. 2a].

The analysis of the number of entries into either the open or closed arms showed a significant effect of sex [ $F(1,76) = 7.56$ ,  $P < 0.01$ ], with a lower number of total entries in males ( $12.9 \pm 0.70$ ) than in females ( $16.3 \pm 1.15$ ). However, the analysis of total arm entries did not reveal a significant

Fig. 1



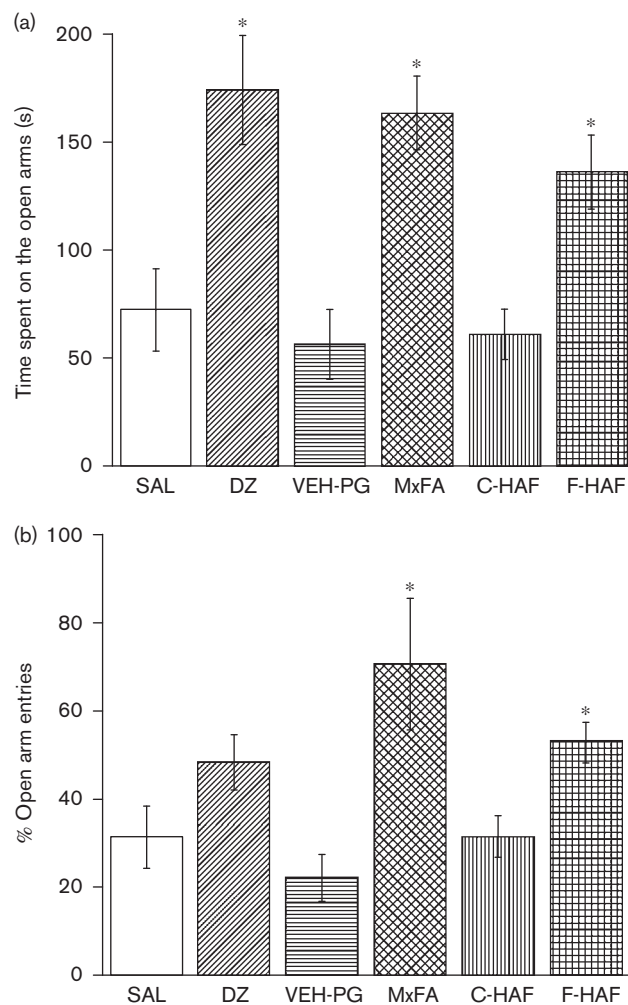
Defensive burying test. Cumulative burying significantly decreased in the diazepam (Dz), fatty acid mixture (MxFA), and fresh amniotic fluid (F-HAF) groups regardless of gender compared with vehicle: centrifuged human amniotic fluid (C-HAF), propylene glycol (VEH), and saline (SAL), respectively. \* $P < 0.05$ , compared with vehicle (Student–Newman–Keuls post-hoc test).

effect of treatment [ $F(5,76) = 1.92$ , NS] or interaction between factors [ $F(5,76) = 1.50$ , NS].

The number of open arm entries was significantly different between sexes [ $F(1,76) = 4.96$ ,  $P < 0.02$ ]. The total number of entries into the open arms was lower in males ( $5.5 \pm 0.55$ ) than in females ( $7.3 \pm 0.75$ ). The treatment factor also reached significance [ $F(5,76) = 6.56$ ,  $P < 0.001$ ]. The post-hoc test showed that the total number of entries into the open arms was greater ( $P < 0.05$ ) in the diazepam ( $8.4 \pm 1.45$ ), fatty acid mixture ( $10.0 \pm 1.26$ ), and fresh human amniotic fluid ( $7.5 \pm 0.62$ ) groups than in the vehicle groups (saline:  $4.9 \pm 1.0$ ; centrifuged human amniotic fluid:  $3.9 \pm 0.68$ ; fatty acid mixture vehicle:  $3.8 \pm 1.06$ ). No significant interaction was found between factors [ $F(5,76) = 1.33$ , NS]. Consistent with these results, the analysis of the percentage of open arm entries (Fig. 2b) revealed a significant effect of treatment [ $F(5,76) = 5.54$ ,  $P < 0.001$ ]. The diazepam, fatty acid mixture, and fresh amniotic fluid groups displayed a higher percentage of open arm entries compared with their respective vehicle groups. Neither the sex factor [ $F(1,76) = 2.42$ , NS] nor the interaction [ $F(5,76) = 0.75$ , NS] reached statistical significance.

No significant differences were found in the risk assessment measures. The latency to the first attempt was similar between sexes [ $F(1,76) = 0.03$ , NS] and treatments [ $F(5,76) = 0.45$ , NS]. Similarly, the number of attempts did not differ between sexes [ $F(1,76) = 0.01$ , NS] and treatments [ $F(5,76) = 1.40$ , NS], and the time spent in attempts did not differ between sexes [ $F(1,76) = 0.83$ , NS] and treatments [ $F(5,76) = 2.09$ , NS]. Similar nonsignificant differ-

Fig. 2



Elevated plus maze. (a) The time spent in the open arms was longer in the diazepam (Dz), fatty acid mixture (MxFA), and fresh amniotic fluid (F-HAF) groups compared with the vehicle groups. (b) Percentage of open arm entries [(open entries)/(total entries)  $\times 100$ ]. The percentage of open arm entries was higher in the diazepam, fatty acid mixture, and fresh amniotic fluid groups than the vehicle groups. \* $P < 0.05$ , compared with vehicle (Student–Newman–Keuls post-hoc test). C-HAF, centrifuged human amniotic fluid; SAL, saline; VEH, propylene glycol.

ences were observed in the latency to head-dipping {sex: [ $F(1,76) = 0.73$ , NS; treatment:  $F(5,76) = 0.85$ , NS]}, number of head-dipping episodes {sex: [ $F(1,76) = 0.01$ , NS; treatment:  $F(5,76) = 0.91$ , NS]}, and time spent head-dipping {sex: [ $F(1,76) = 1.14$ , NS; treatment:  $F(5,76) = 0.93$ , NS]}.

#### Open field test

The most important differences in the open field test were attributable to sex differences. The number of entries was significantly [ $F(1,76) = 28.47$ ,  $P < 0.001$ ] higher in females ( $237.0 \pm 10.56$ ) than in males ( $165.3 \pm 8.99$ ). No significant effects were found for treatment [ $F(5,76) = 2.27$ ,

$P = 0.056$ ], and no interaction between factors was observed [ $F(5,76) = 1.59$ , NS]. These sex differences were confirmed by the analysis of the distance traveled [ $F(1,76) = 48.61$ ,  $P < 0.001$ ; male:  $2341.9 \pm 236.03$  cm; female:  $3675.9 \pm 154.49$  cm] and total resting time [ $F(1,76) = 33.04$ ,  $P < 0.001$ ; male  $137.8 \pm 6.59$  s; female  $90.0 \pm 4.29$  s] but no significant treatment effect or interaction between factors was observed.

## Discussion

This study explored the anxiolytic-like effects of human amniotic fluid and a mixture of eight of its fatty acids in the defensive burying test and elevated plus maze in female and male Wistar rats. Fresh amniotic fluid and a mixture of eight fatty acids, similar to diazepam, reduced cumulative burying, indicating an anxiolytic-like effect. This reduction in cumulative burying (approximately one-third of controls) and the absence of effects on locomotion produced by fresh human amniotic fluid or the mixture of eight fatty acids resembled the effects of drugs with proven clinical anxiolytic efficacy (Treit, 1985a, 1985b). The results from the elevated plus maze confirmed these observations: fresh amniotic fluid and the fatty acid mixture increased the time spent on and percentage of entries into the open arms to a similar extent as diazepam, which was higher than the vehicles. These changes occurred in the absence of treatment-related changes in general locomotor activity in the open field test or elevated plus maze, therefore discarding the possibility of sedative effects.

In the defensive burying test, the time elapsed between the first shock and first attempt at burying (i.e. latency) inversely relates to the rat's reactivity. Similarly, the total time spent burying (i.e. cumulative burying) is an indicator of anxiety (Treit, 1985a). We found that fresh amniotic fluid and the fatty acid mixture reduced burying to a similar extent as diazepam, suggesting an anxiolytic action. The elevated plus maze is a widely used behavioral test that assesses anxiety-like behavior and the anxiogenic-like or anxiolytic-like effects of pharmacological agents (Walf and Frye, 2007). Animals that display anxiety-like behavior in the elevated plus maze usually show reductions in both the number of entries into and the time spent on the open arms. Risk assessment may also be evaluated because it is invariably observed in potentially dangerous situations. Risk assessment has been shown to be more sensitive to the effects of classic (i.e. benzodiazepine receptor ligands) and atypical (i.e. serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligands) anxiolytics (Griebel *et al.*, 1997). The results from the elevated plus maze also support the idea of an anxiolytic action of amniotic fluid and its fatty acids, because, rats treated with fresh amniotic fluid or its fatty acids exhibited an increased time spent in the open arms, which was similar to the effect of diazepam. We did not observe any significant changes in risk assessment behaviors. The

absence of effects suggests that the anxiolytic action of amniotic fluid or its fatty acids may be attributable to actions other than at the 5-HT<sub>1A</sub> receptor (Griebel *et al.*, 1997). However, the similarity of action between amniotic fluid, the fatty acid mixture, and diazepam suggests an action possibly related to  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors, a possibility that remains to be explored.

Burying latency is usually considered an indicator of reactivity. In this study, the burying latency was longer in males than in females after exposure to amniotic fluid and the fatty acid mixture, and this difference was related to a longer burying latency only in males. Similarly, in the elevated plus maze, the total number of entries was higher in females than in males. The significant differences observed in the open field test were related to sex. Females displayed more entries to adjacent squares and traveled longer distances during the 5 min test compared with males. Females spent less time resting immobile in one square than males. These results are consistent with previous studies (Stöhr *et al.*, 1998; Romero and Chen, 2004) and seemingly explain the shorter latency to bury the probe (burying behavior tests) and the greater number of entries into the open arms and percentage of open arm entries (elevated plus maze) in the female groups. Because the treatments did not alter locomotor activity, the other behavioral results are unlikely to be related to a sedative effect.

The hormonal profile analysis verified that fresh and centrifuged human amniotic fluid contains estradiol and progesterone. The estradiol concentration in human amniotic fluid was only approximately 0.005%, and the anxiolytic dose in rats ranges from 0.10 to 4.0  $\mu\text{g}/\text{rat}/1.0$  ml (Koss *et al.*, 2004; Walf and Frye, 2005). Similarly, the progesterone content in human amniotic fluid is approximately 50 ng/ml, and the anxiolytic dose in rats is approximately 1.0 mg/rat (Martínez-Mota *et al.*, 2000). Progesterone concentrations in human amniotic fluid are, therefore, approximately  $10^{-6}$  less than the anxiolytic dose of progesterone observed in rats. However, centrifuged amniotic fluid contained the same amount of estradiol and progesterone as fresh amniotic fluid, but only fresh amniotic fluid reduced burying. Therefore, the participation of steroids in these effects seems to be very low or nonexistent. The most significant components of human amniotic fluid in these anxiolytic-like effects seemed to be related primarily to fatty acids: (a) the injection of a fatty acid mixture reproduced the effects found with amniotic fluid; and, (b) the centrifuged amniotic fluid (with a blunted content of fatty acids) was devoid of anxiolytic-like effects.

Finally, the interspecies experimental design used in this study is supported by the strong similarities in amniotic fluid among mammals (Lévy *et al.*, 1983; Pérez *et al.*, 1993) and some interspecies actions of amniotic fluid

(Corpening *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2007; Castro-Combs *et al.*, 2008; Coban *et al.*, 2009; Kerimoğlu *et al.*, 2009). These results are supported by Pageat (2001), who isolated the skin secretions of mammals and developed a fatty acid mixture that was similar in composition to sow skin secretions. A composition composed of a mixture of fatty acids, including linoleic acid, oleic acid, and palmitic acid or their derivatives, derived from the secretions of mammalian mammary glands was produced. This composition decreased stress, anxiety, and aggressiveness in mammals. This formulation was thought to contain the essential elements of a possible maternal pheromone. Pageat and Teissier (1998) reported preliminary results in which use of this synthetic pheromone reduced aggressive pig biting when piglets were mixed after weaning.

In summary, fresh human amniotic fluid and the mixture of eight fatty acids produced anxiolytic-like profiles (i.e. decreased cumulative burying, increased time spent in the open arms of the elevated plus maze, and no changes in locomotion) that were similar to the effects of diazepam. We conclude that human amniotic fluid produced anxiolytic-like effects in both female and male Wistar rats, which may be related to the fatty acid content.

## Acknowledgements

The authors thank Michael Arends for revising and editing the English of this manuscript and the Hospital Escuela from the Universidad Veracruzana facilities for obtaining the human samples. This study was partially supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT: CB-2006-1, 61741), who did not participate in the study design, data collection, data analysis, interpretation of the data, writing of the manuscript, or decision to submit the paper for publication. García-Ríos R.I. and Cueto-Escobedo J. received fellowships from CONACyT (Reg. 203280 and 171055, respectively).

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## References

- Aikey JL, Nyby JG, Anmuth DM, James PJ (2002). Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (*Mus musculus*). *Horm Behav* **42**:448–460.
- Atkinson G, Campbell DJ, Cawood ML, Oakey RE (1996). Steroids in human intrauterine fluids of early pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* **44**: 435–440.
- Castro-Combs J, Noguera G, Cano M, Yew M, Gehlbach PL, Palmer J, *et al.* (2008). Corneal wound healing is modulated by topical application of amniotic fluid in an *ex vivo* organ culture model. *Exp Eye Res* **87**:56–63.
- Coban I, Satoğlu IS, Gültekin A, Tuna B, Tatari H, Fidan M (2009). Effects of human amniotic fluid and membrane in the treatment of Achilles tendon ruptures in locally corticosteroid-induced Achilles tendinosis: an experimental study on rats. *Foot Ankle Surg* **15**:22–27.
- Contreras CM, Gutiérrez-García AG (2010). Emotional memory and chemical communication. In: Benítez-King G, Cisneros-Berlanga C, editors. *The neurobiological sciences applied to psychiatry: from genes, proteins, and neurotransmitters to behavior*. Kerala: Research Signpost. pp. 171–188.
- Corpening JW, Doerr JC, Kristal MB (2000). Ingested bovine amniotic fluid enhances morphine antinociception in rats. *Physiol Behav* **70**:15–18.
- Egan RW, Gale PH, Baptista EM, Kennicott KL, VandenHeuvel WJ, Walker RW, *et al.* (1981). Oxidation reactions by prostaglandin cyclooxygenase-hydroperoxidase. *J Biol Chem* **256**:7352–7361.
- Fernández-Guasti A, Picazo O (1992). Changes in burying behavior during the estrous cycle: effect of estrogen and progesterone. *Psychoneuroendocrinology* **17**:681–689.
- Griebel G, Sanger D, Perrault G (1996). The use of the rat elevated plus-maze to discriminate between non-selective and Bz-1 ( $\omega$ 1) selective, benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacology* **124**:245–254.
- Griebel G, Rodgers RJ, Perrault G, Sanger DJ (1997). Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* **57**:817–827.
- Guiraudie-Capraz G, Slomianny MC, Pageat P, Malosse C, Cain AH, Orgeur P, *et al.* (2005). Biochemical and chemical supports for a transnatal olfactory continuity through sow maternal fluids. *Chem Senses* **30**: 241–251.
- Kerimoğlu S, Livaoglu M, Sönmez B, Yuluğ E, Aynaci O, Topbas M, *et al.* (2009). Effects of human amniotic fluid on fracture healing in rat tibia. *J Surg Res* **152**:281–287.
- Koss WA, Gehlert DR, Shekhar A (2004). Different effects of subchronic doses of 17- $\beta$  estradiol in two ethologically based models of anxiety utilizing female rats. *Horm Behav* **46**:158–164.
- Lévy F, Poindron P, Le Neindre P (1983). Attraction and repulsion by amniotic fluids and their olfactory control in the ewe around parturition. *Physiol Behav* **31**:687–692.
- Martinez-Mota L, Estrada-Camarena E, López-Rubalcava C, Contreras CM, Fernández-Guasti A (2000). Interaction of desipramine with steroid hormones on experimental anxiety. *Psychoneuroendocrinology* **25**:109–120.
- National Research Council (1985). *Guide for the care and use of laboratory animals* [publication no. 85-23]. Washington, DC: National Academy Press.
- Pageat P (2001). Pig appeasing pheromones to decrease stress, anxiety and aggressiveness. *US Pat* **169 (No. 6)**:113.
- Pageat P, Teissier Y (1998). Usefulness of a porcine pheromone analogue in the reduction of aggression between weaners on penning: behavioural study. *Proceedings: 15th International Pig Veterinary Society Congress, 5–9 July, 1998, Birmingham, England*. Nottingham: Nottingham University Press, p. 413.
- Pan HC, Cheng FC, Chen CJ, Lai SZ, Lee CW, Yang DY, *et al.* (2007). Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clin Neurosci* **14**: 1089–1098.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open:closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* **14**:149–167.
- Pérez MD, Puylol P, Ena JM, Calvo M (1993). Comparison of the ability to bind lipids of beta-lactoglobulin and serum albumin of milk from ruminant and non-ruminant species. *J Dairy Res* **60**:55–63.
- Picazo O, Fernández-Guasti A (1985). Anti-anxiety effects of progesterone and some of its reduced metabolites: an evaluation using the burying behavior test. *Brain Res* **680**:135–141.
- Pinel JP, Treit D (1978). Burying as a defensive response in rats. *J Comp Physiol Psychol* **92**:708–712.
- Rhodes ME, Balestreire EM, Czambel RK, Rubin RT (2002). Estrous cycle influences on sexual diergism of HPA axis responses to cholinergic stimulation in rats. *Brain Res Bull* **59**:217–225.
- Romero RD, Chen WJ (2004). Gender-related response in open-field activity following developmental nicotine exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **78**:675–681.
- Schaal B, Marlier L (1998). Maternal and paternal perception of individual odor signatures in human amniotic fluid: potential role in early bonding? *Biol Neonate* **74**:266–273.
- Schapiro S, Salas M (1970). Behavioral response of infant rats to maternal odor. *Physiol Behav* **5**:815–817.
- Stöhr T, Schulte Wermeling D, Weiner I, Feldon J (1998). Rat strain differences in open-field behavior and the locomotor stimulating and rewarding effects of amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* **59**:813–818.
- Treit D (1985a). Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci Biobehav Rev* **9**:203–222.
- Treit D (1985b). The inhibitory effect of diazepam on defensive burying: anxiolytic versus analgesic effects. *Pharmacol Biochem Behav* **22**:47–52.
- Valdes R Jr, Jortani SA (2002). Unexpected suppression of immunoassay results by cross-reactivity: now a demonstrated cause for concern. *Clin Chem* **48**:405–406.

- Varty GB, Morgan CA, Cohen-Williams ME, Coffin VL, Carey GJ (2002). The gerbil elevated plus-maze: I. Behavioral characterization and pharmacological validation. *Neurosyndromology* **27**:357–370.
- Walf AA, Frye CA (2005). ER $\beta$ -selective estrogen receptor modulators produce antianxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats. *Neuropsychopharmacology* **30**:1598–1609.
- Walf AA, Frye CA (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* **2**:322–328.
- Walf AA, Frye CA (2008). Conjugated equine estrogen enhances rats' cognitive, anxiety, and social behavior. *Neuroreport* **19**:789–792.
- Walf AA, Frye CA (2010). Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. *Physiol Behav* **99**:169–174.
- Wilson MA, Burghardt PR, Ford KA, Wilkinson MB, Primeaux SD (2004). Anxiolytic effects of diazepam and ethanol in two behavioral models: comparison of males and females. *Pharmacol Biochem Behav* **78**: 445–458.

## APÉNDICE II

Cueto-Escobedo, J., Contreras, C.M., Bernal-Morales, B., Guillén-Ruiz, G. & Rodríguez-Landa, J.F. (2013). Defensive burying test in postweaning rats: utility of a small round chamber. *Behavioural Pharmacology*, 24:693–698.



# Defensive burying test in postweaning rats: utility of a small round chamber

Jonathan Cueto-Escobedo<sup>a</sup>, Carlos M. Contreras<sup>a,b</sup>, Blandina Bernal-Morales<sup>a</sup>, Gabriel Guillén-Ruiz<sup>a</sup> and Juan F. Rodríguez-Landa<sup>a</sup>

The defensive burying test is an experimental model that is used to explore anxiety-like behavior in adult rats. Because the expression of anxiety-like behavior may be different between infant and adult rats, we tested the impact of chambers with different sizes and shapes on defensive burying in 28-day-old Wistar rats. The first two chambers had a base area of 560 cm<sup>2</sup>, but one was rectangular and the other was round. The base area of the other two chambers was 282 cm<sup>2</sup>, but one was rectangular and the other was round. We examined the effects of vehicle and 1 mg/kg diazepam on defensive burying in the various chambers. Locomotor activity was also measured to identify or exclude any sedative effects. Independent of the treatments, the infant rats showed a shorter burying latency in the three modified chambers and a longer cumulative burying time compared with the original apparatus. The effects of diazepam (i.e. increased latency and decreased burying time) were only significant

in the small round chamber, without significant effects on general motor activity. These results suggest that a small round chamber that is used to test burying behavior is sensitive to the anxiolytic actions of diazepam when the experimental subjects are very young rats. *Behavioural Pharmacology* 24:693–698 © 2013 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

*Behavioural Pharmacology* 2013, 24:693–698

**Keywords:** animal model, anxiety, defensive burying, diazepam, infant rat

<sup>a</sup>Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana and <sup>b</sup>Unidad Periférica Xalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Mexico

Correspondence to Carlos M. Contreras, DSc, Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Av. Dr. Luis Castelazo s/n, Col. Industrial Ánimas, Xalapa, Veracruz, 91190, Mexico  
E-mail: ccontreras@uv.mx; contreras@biomedicas.unam.mx

Received 9 May 2013 Accepted as revised 24 September 2013

## Introduction

The experimental models used to explore anxiety commonly include only adult animals, usually rodents, despite the fact that anxiety is an emotional disorder that occurs not only in adults but also in children (Kessler *et al.*, 2005; Shamir-Essakow *et al.*, 2005) and adolescents (Medina-Mora *et al.*, 2007). Attention in a neonatal intensive care unit at birth may be related to an increased risk for the subsequent development of separation anxiety disorder (Karabel *et al.*, 2012). Social phobia, for which the age of onset is ~11 years old, is the most common anxiety disorder at this age, and constitutes a risk factor for subsequent depressive illness and the development of substance abuse (Chavira *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2004; Kessler *et al.*, 2005; Stein and Stein, 2008).

The clinical manifestations of anxiety differ by age. From birth to 18 months of age, anxiety is expressed predominantly as separation anxiety disorder, sleep disturbances, and nocturnal panic attacks. Later, at ~3 years of age, specific phobias and panic disorder can occur. By the age of 5 years, the symptoms of generalized anxiety disorder and panic attacks may be detected. During primary/elementary school (5–7 years of age), specific phobias, obsessive compulsive disorder, post-traumatic stress disorder, generalized anxiety disorder, and social anxiety disorder can occur. Afterward, during adolescence (12–18 years of age), anxiety may adopt the

form of fear of negative evaluation and social anxiety disorder (Beesdo *et al.*, 2009; Abbo *et al.*, 2013). Between 23 and 30 years of age, panic disorder, major depression, and generalized anxiety disorder are most common (Kessler *et al.*, 2012).

The diversity of clinical manifestations associated with anxiety through the lifespan must be considered (Campbell *et al.*, 2000) for special assessment strategies and the recognition of special features at each age (Beesdo *et al.*, 2009). The same age-related occurrences are seemingly relevant to the experimental study of anxiety and the action of anxiolytic drugs in animal models.

The scarcity of animal models to test anxiety in very young animals limits the study of anxiolytic drugs for this particular age group. Animal models utilize rodents to test anxiety-like behavior and anxiolytic drug actions. The defensive burying test is an accepted and validated experimental model of experimental anxiety in adults (Treit *et al.*, 1981; De Boer and Koolhaas, 2003; Wilson *et al.*, 2004). However, the expression of anxiety-like behavior in this test may differ between infants, juveniles, and adults (Treit and Pinel, 2005; Arakawa, 2007). In contrast to adult rats, when anxiety-like behavior is investigated on postnatal day (PND) 28 (i.e. in very young rats) using the same chamber as that used to test anxiety-like behavior in adult rats, the younger rats

spend less time burying the prod. Young rats reach adult levels of burying behavior by approximately PND77 (Pinel *et al.*, 1989). Under these conditions, the effects of anxiolytic drugs are seemingly undetectable at weaning (López-Rubalcava *et al.*, 1996). However, burying behavior in adults is sensitive to the shape and size of the chamber. Rodent species that do not show burying behavior in rectangular chambers may perform such behavior in circular chambers (Davis *et al.*, 1982). Furthermore, a chamber with smaller dimensions promotes burying behavior (Pinel *et al.*, 1980). Using other measures of anxiety-like behavior, such as ultrasonic vocalizations, the actions of clinically effective anxiolytic drugs are detectable in rats as young as PND7 (Vivian *et al.*, 1997) and newborn mice (Fish *et al.*, 2000; Rowlett *et al.*, 2001). Therefore, the apparent absence of the detectable effects of anxiolytic drugs in the burying test in very young animals may be attributable to the shape and size of the chamber used to test burying behavior.

The aim of the present study was to construct and explore the impact of four chambers with different sizes and shapes on burying behavior in recently weaned rats (PND28). To validate the test, we compared the effects of vehicle and diazepam, a clinically effective anxiolytic drug that is widely used as an active control in these types of studies.

## Methods

### Subjects

The procedures strictly followed the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996) promulgated by the National Institutes of Health and Mexican law requirements (NOM-062-ZOO-1999, 1999). The general protocol was approved by the Ethical Committee of the Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico.

The experiments were conducted using inbred Wistar rats provided by the Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Mexico. During gestation and after delivery, each dam and its litter of ~10 pups were allocated to acrylic boxes (44 × 33 cm base, 20 cm height) under a 12-h/12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h) with free access to water and food. The nest remained as undisturbed as possible, and the dams and pups were handled as little as possible while changing the bedding material. The offspring were weaned on PND21, assigned randomly to the experimental groups, and allocated to six to eight animals per cage in separate cages (44 × 33 cm base, 20 cm height). No more than three subjects from the same litter were in the same experimental group.

### Chambers

We constructed four different chambers (Fig. 1), each 25 cm high, but with different shapes and floor surface

areas. The first chamber was a large rectangular chamber (28 × 20 cm) that was based on the original model (Pinel and Treit, 1978; Pinel *et al.*, 1980) and had the largest floor area (560 cm<sup>2</sup>). The other chambers had different sizes and shapes from the apparatus that is commonly used in adults. The second chamber was a large round chamber (26.7 cm diameter) that had a floor area (559.9 cm<sup>2</sup>) similar to that of the first chamber. The third chamber was a small rectangular chamber (20.3 × 13.8 cm base) that had a smaller floor area (280.14 cm<sup>2</sup>). The fourth chamber was a small round chamber (19 cm diameter) that had a small floor area (283.5 cm<sup>2</sup>). In all chambers, an electrode (7 cm length, 0.5 cm diameter) protruded horizontally 1 cm above the sawdust bed from the wall of the apparatus (the shorter wall in the rectangular chambers).

### Experimental groups

After being sexed on PND28, the rats were assigned randomly to the groups tested in the four different chambers. Half of each group received diazepam (Valium 10, 1 mg/kg, intraperitoneally; Hoffman-Roche, Basel, Switzerland) and the other half received vehicle (0.9% NaCl, intraperitoneally) 60 min before the defensive burying test.

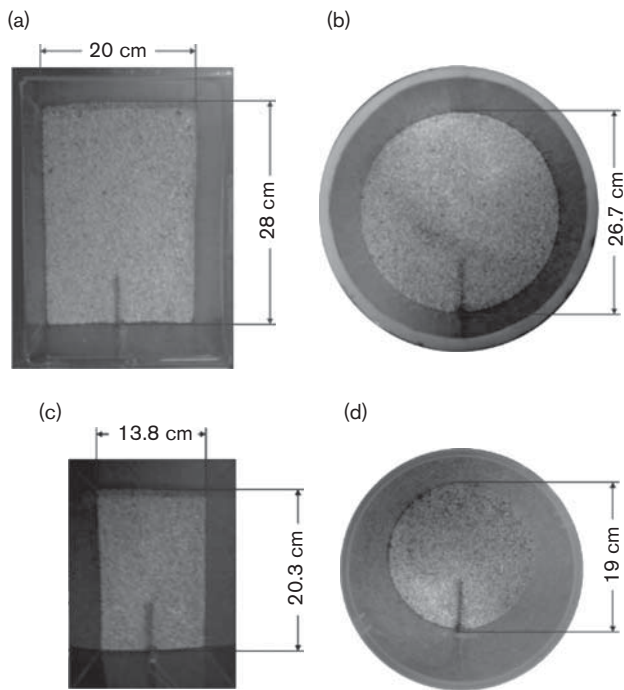
The subgroups were matched by sex and included a similar number of subjects: large rectangular chamber (vehicle, *n* = 13; diazepam, *n* = 11), large round chamber (vehicle, *n* = 12; diazepam, *n* = 15), small rectangular chamber (vehicle, *n* = 15; diazepam, *n* = 15), and small round chamber (vehicle, *n* = 14; diazepam, *n* = 14).

### Defensive burying test

During the tests, the chambers were placed in a sound-isolated box (55 × 40 × 46 cm; Coulbourn Instruments, Whitehall, Pennsylvania, USA). Wood chips (Teklad Sani Chips 7990, 2 mm diameter; Harlan, Madison, Wisconsin, USA) were used as the bedding material, which was changed at the end of each test.

The rats were individually and gently placed into the respective chamber far from the electrode. The rat then explored the chamber. When it touched the electrode, it received a direct current (0.1–0.3 mA) delivered by an electronic stimulator (Grass Instruments S44, Quincy, Massachusetts, USA) coupled in series to a stimulus isolation unit (Grass Instruments SIU5) and constant-current generator (Grass Instruments CCUIA). On the basis of a pilot study, the intensity of the direct current was the minimal effective intensity that produced burying behavior in infant rats. After the rat touched the electrode, the latency to bury the probe and cumulative burying time were assessed in a 10-min session. Each test was video recorded and later scored by at least two observers. The data were validated only when the observers reached a level of agreement greater than

Fig. 1



Chambers used in the study. (a) Large rectangular chamber; (b) large round chamber; (c) small rectangular chamber; (d) small round chamber.

95%. For interpretation of the data, burying latency was considered an indicator of reactivity when an animal copes with stressful stimuli (Rodríguez-Manzo *et al.*, 1999; Contreras *et al.*, 2011), and cumulative burying time was considered an indicator of anxiety-like behavior (Pinel and Treit, 1978; Barret, 1991).

#### Locomotor activity test

To assess general locomotor activity, ~3 min after the burying test, each rat was placed in a locomotor activity monitor (Letica model LE 8811; Panlab S.L., Barcelona, Spain) that consisted of a black Perspex base (44 × 45 cm) with four transparent Perspex walls (36 cm height). Each test lasted 5 min. General locomotor activity was recorded automatically by infrared detectors and data analysis software (Acti-Track v2.7.10; PanLab S.L.).

For data analysis, the floor of the cage was divided into five equally sized virtual squares (four peripheral squares and one central square), and we measured the total number of entries into each square (i.e. crossings) and the time spent active (defined as moving at more than 4 cm/s). Tests were performed between 11:00 and 15:00 h.

#### Statistical analysis

The data were analyzed using three-way analysis of variance (ANOVA) for independent groups, with the size and shape of the chamber as the first factor (four levels: large

rectangular chamber, large round chamber, small rectangular chamber, and small round chamber), treatment as the second factor (two levels: vehicle and diazepam), and sex as the third factor (two levels: male and female). *P* values of 0.05 or less in the ANOVA were followed by the Bonferroni post-hoc test. Statistica 7.0 software was used for the data analyses (Stat Soft. Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). The results are expressed as mean ± SEM.

## Results

### Defensive burying test

#### Latency

The three-way ANOVA showed that the size and shape of the chambers exerted a significant effect on burying latency ( $F_{3,93} = 12.74$ ,  $P < 0.001$ ). The post-hoc test indicated that the rats evaluated in the three modified chambers (large round:  $184.9 \pm 26.3$  s; small rectangular:  $174.6 \pm 36.4$  s; small round:  $240.4 \pm 44.9$  s) showed a shorter burying latency than the rats evaluated in the large rectangular chamber ( $462.4 \pm 41.1$  s). The treatment factor also reached statistical significance ( $F_{1,93} = 9.98$ ,  $P < 0.002$ ): burying latency was longer in the diazepam-treated groups ( $309.0 \pm 30.5$  s) than in the vehicle-treated groups ( $204.9 \pm 29.0$  s). No significant sex differences were found (males:  $262.1 \pm 30.6$  s; females:  $252.7 \pm 30.6$  s;  $F_{1,93} = 0.281$ , NS). The chamber × treatment interaction did not reach significance ( $F_{3,93} = 0.67$ , NS).

#### Cumulative burying

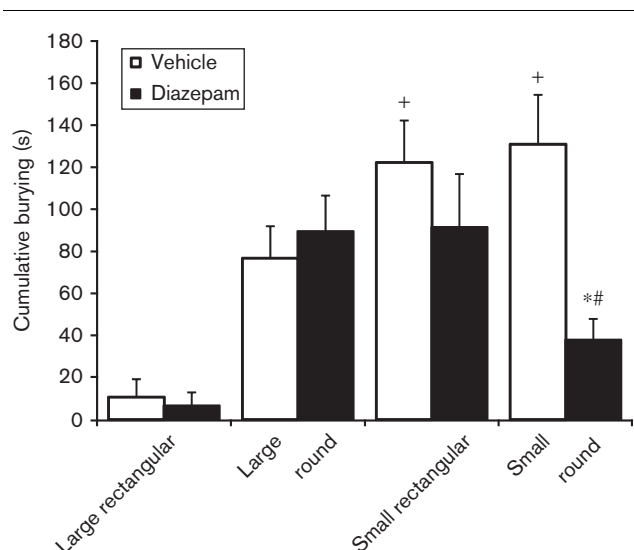
The statistical analysis of cumulative burying time showed a significant effect of chamber ( $F_{3,93} = 10.03$ ,  $P < 0.001$ ). Independent of the treatments and sex, cumulative burying time was longer in the modified chambers (large round:  $83.8 \pm 11.5$  s; small rectangular:  $106.9 \pm 16.1$  s; small round:  $84.4 \pm 15.4$  s) than in the large rectangular chamber ( $8.84 \pm 5.3$  s). A significant effect of treatment was also found ( $F_{1,93} = 5.78$ ,  $P < 0.02$ ). The post-hoc analysis indicated that the diazepam-treated groups showed a shorter cumulative burying time ( $60.3 \pm 9.7$  s) than the vehicle-treated groups ( $87.5 \pm 11.0$  s). No significant sex differences were found (males:  $65.1 \pm 9.7$  s; females:  $82.7 \pm 11.2$  s;  $F_{1,93} = 0.704$ ,  $P = 0.403$ ). A significant chamber × treatment interaction was found for cumulative burying time ( $F_{3,93} = 2.94$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 2). The modified chambers produced a longer burying time than the original large rectangular chamber, and the reduction in the cumulative burying time induced by diazepam was only significant ( $P < 0.01$ ) in the small round chamber.

#### Locomotor activity test

##### Crossings

The three-way ANOVA showed that the chamber size and shape influenced the number of crossings in the locomotor activity test ( $F_{3,93} = 17.42$ ,  $P < 0.001$ ). The post-hoc test indicated that the rats tested previously in

Fig. 2



Cumulative burying time. The smaller chambers (both rectangular and round) produced longer burying times than the large rectangular chamber. Diazepam reduced the cumulative burying time only in the small round chamber, compared with vehicle.  $^+P < 0.05$ , compared with vehicle and diazepam in the large rectangular chamber;  $^#P < 0.05$ , compared with vehicle in the small rectangular chamber;  $^*P < 0.05$ , compared with vehicle in the small round chamber (Bonferroni's test). Note the floor effect in the large rectangular chamber.

the small round chamber showed a greater number of crossings ( $79.8 \pm 5.8$ ) than the rats tested previously in the other chambers (large round:  $45.8 \pm 3.7$ ; small rectangular:  $41.0 \pm 2.5$ ; large rectangular:  $48.3 \pm 3.8$ ), independent of treatment and sex. The factors treatment (vehicle:  $53.8 \pm 3.6$ ; diazepam:  $53.7 \pm 3.5$ ;  $F_{1,93} = 0.08$ , NS) and sex (males:  $55.5 \pm 3.9$ ; females:  $52.0 \pm 3.2$ ;  $F_{1,93} = 0.49$ , NS) did not reach statistical significance. The chamber  $\times$  treatment interaction was also not significant ( $F_{3,93} = 0.74$ , NS).

### Activity time

Activity in the locomotor activity test was influenced by the size and shape of the chambers ( $F_{3,93} = 6.83$ ,  $P < 0.005$ ), but not by treatment (vehicle:  $121.1 \pm 5.1$  s; diazepam:  $118.9 \pm 5.6$  s;  $F_{1,93} = 0.21$ , NS) or sex (males:  $123.9 \pm 5.3$  s; females:  $116.15 \pm 5.4$  s;  $F_{1,93} = 0.69$ , NS). The chamber  $\times$  treatment interaction was not significant ( $F_{3,93} = 1.00$ , NS). The post-hoc test indicated that rats subjected previously to the burying test in the small round chamber showed  $\sim 30\%$  more activity ( $145.2 \pm 7.1$  s) in the locomotor activity test than the rats that were subjected previously to the burying test in the other chambers (large round:  $104.4 \pm 7.1$  s; small rectangular:  $104.9 \pm 5.6$  s; large rectangular:  $127.3 \pm 8.1$  s).

### Discussion

In the present study, we compared the influence of the size and shape of the test chamber on burying behavior in

infant rats. We found that the original chamber used to test anxiety-like behavior in adult rats may be subject to a 'floor effect' in infant rats, in which any other factor that reduces cumulative burying behavior becomes undetectable. The typical actions of diazepam in the burying test (i.e. lower cumulative burying time and longer burying latency; Treit *et al.*, 1981; Contreras *et al.*, 2011) were only detectable in the small round chamber. The use of a small round chamber produced a shorter burying latency (approximately half of the latency observed in the large rectangular chamber) and a longer cumulative burying time (approximately seven-fold higher than the time observed in the large rectangular chamber). A single dose of diazepam (1 mg/kg) effectively reduced cumulative burying time only in the group of infant rats subjected to the small round cage.

The actions of this single dose of diazepam have been reported extensively in diverse experimental models of anxiety. Diazepam exerts actions on  $\gamma$ -aminobutyric acid-A (GABA<sub>A</sub>) receptors (Enna, 2007; Uusi-Oukari and Korpi, 2010) and produces anxiolytic-like effects in adult rats in several experimental models. The maturation and distribution of GABA receptors is age dependent, and full GABAergic function in adults is reached  $\sim 30$  days after birth (Hsu *et al.*, 2003; Fritschy *et al.*, 2004). In the present study, diazepam reduced burying behavior in the round chamber on PND28, indicating that infant rats are sensitive to this anxiolytic drug, but the results may depend on the device and test used.

We tested the rats 60 min after the injection of diazepam. The dose was chosen because it is the lowest dose most often studied in adult rats (Pellow *et al.*, 1985; Bert *et al.*, 2001; de Boer and Koolhaas, 2003; Korte and de Boer, 2003; Simpson *et al.*, 2012) but also because a similar dose of diazepam ( $\leq 1$  mg/kg) administered 30, 60, and 120 min before the ultrasonic vocalization test was shown to produce anxiolytic-like effects in pups on PND3, PND6, PND9, and PND12 (Naito *et al.*, 1998). These studies indicate that 60 min after a single injection of diazepam is an appropriate time to explore anxiolytic actions in very young animals.

In the present study, modification of the size and shape of the chambers produced shorter latencies and longer burying times. Rodents spend a longer time covering the electrode in smaller chambers than in larger chambers, possibly because the larger chamber provides the animal with the opportunity to distance itself from the electrode instead of covering it (Pinel *et al.*, 1980; Maggio and Harder, 1983). Rodents also prefer walls and corners over open spaces (Choleris *et al.*, 2001); consequently, the presence of corners in the rectangular chamber may be associated with other behavioral responses that may interfere with burying behavior (Davis *et al.*, 1982). In the present study, the small round chamber was devoid of corners and represented a smaller space than the

rectangular chamber, producing a level of burying that was sensitive to drug treatment.

The burying test has biological validity because it represents an evolved adaptation of rodents to natural threatening stimuli (homology); similarly, burying behavior is directed toward the neutralization of a dangerous or threatening stimulus (isomorphism; Treit *et al.*, 2010). In the present study, the small round chamber was apparently more stressful than the other chambers because of the lack of corners and proximity to the prod. It also elicited the well-known defensive burying response that is studied extensively in adult rats, resulting in a considerable amount of cumulative burying time that was reduced by the clinically validated diazepam, thus providing predictive validity.

An anxiolytic dose of diazepam does not influence locomotor behavior in adult rats (Treit *et al.*, 1981; Contreras *et al.*, 2011; Bouffleur *et al.*, 2012). In the present study, the actions of diazepam in the small round chamber were not related to any changes in locomotion. We did not detect any effect of treatment on the number of crossings or other variables in the open-field test, discarding any possible sedative effect that may have accounted for the reduction in burying behavior. We also did not observe any sex differences, similar to PND21 rats (Bernal-Morales *et al.*, 2009). In fact, sex differences in locomotor activity occur after puberty when female rats show greater locomotor activity than males (Frye and Walf, 2002).

Some possible limitations of the present study include the fact that we did not explore any dose–response relationship and did not compare results from modified chambers with respect to burying behavior in adult rats. However, we used a currently accepted effective dose of diazepam in young rats (Naito *et al.*, 1998), and the impact of modifications of the surface area of the chamber on burying behavior has already been reported in adults (Pinel *et al.*, 1980; Maggio and Harder, 1983). Another possible limitation of the present study is that the infant rats were habituated to the test room but not to the chamber. Although the original model of the burying test suggests habituation of adult rats to the chamber 3 days before the test (Treit *et al.*, 1981), our group and other researchers have shown that the anxiolytic-like action of diazepam is detectable without an habituation session in adult rats subjected to the burying test (Gutiérrez-García *et al.*, 2006; Olvera-Hernández and Fernández-Guasti, 2011; García-Ríos *et al.*, 2013), and similar observations were made in the present study with PND28 rats.

## Conclusion

Infant rats may be reliably subjected to experimental models of anxiety that are sensitive to anxiolytic drugs, but the detection of anxiolytic-like effects depends on the chamber used. A small round chamber may be the best choice for testing defensive burying behavior in young rats.

## Acknowledgements

The authors thank Michael Arends for revising and editing the English of this manuscript. This study was supported partially by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT: CB-2006-1, 61741), and DGAPA-PAPIIT IN211111-3 from Universidad Nacional Autónoma de México, who did not participate in the study design, data collection, data analysis, interpretation of the data, writing of the manuscript, or decision to submit the paper for publication. J.C.-E and G.G.-R. received fellowships from CONACyT (Reg. 197556 and 249708, respectively).

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## References

- Abbo C, Kinyanda E, Kizza RB, Levin J, Ndyabangi S, Stein DJ (2013). Prevalence, comorbidity and predictors of anxiety disorders in children and adolescents in rural north-eastern Uganda. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health* 7:21.
- Arakawa H (2007). Ontogeny of sex differences in defensive burying behavior in rats: effect of social isolation. *Aggress Behav* 33:38–47.
- Barret JE (1991). Animal behavior models in the analysis and understanding of anxiolytic drugs acting at serotonin receptors. In: Oliver B, Moss J, Slangen JL, editors. *Animal models in psychopharmacology*. Basel: Birkhauser Verlag. pp. 137–155.
- Beesdo K, Knappe S, Pine DS (2009). Anxiety and anxiety disorders in children and adolescents: developmental issues and implications for DSM-V. *Psychiatr Clin North Am* 32:483–524.
- Bernal-Morales B, Contreras CM, Cueto-Escobedo J (2009). Acute restraint stress produces behavioral despair in weanling rats in the forced swim test. *Behav Process* 82:219–222.
- Bert B, Fink H, Sohr R, Rex A (2001). Different effects of diazepam in Fisher rats and two stocks of Wistar rats in tests of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 70:411–420.
- Bouffleur N, Antoniazzi CT, Pase CS, Benvegnú DM, Barcelos RC, Dolci GS, *et al.* (2012). Neonatal tactile stimulation changes anxiety-like behavior and improves responsiveness of rats to diazepam. *Brain Res* 1474:50–59.
- Campbell MA, Rapee RM, Spence SH (2000). Developmental changes in the interpretation of rating format on a questionnaire measure of worry. *Clin Psychol* 5:49–59.
- Chavira DA, Stein MB, Bailey K, Stein MT (2004). Child anxiety in primary care: prevalent but untreated. *Depress Anxiety* 20:155–164.
- Cholieris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev* 25:235–260.
- Contreras CM, Rodríguez-Landa JF, Gutiérrez-García AG, Mendoza-López MR, García-Ríos RI, Cueto-Escobedo J (2011). Anxiolytic-like effects of human amniotic fluid and its fatty acids in Wistar rats. *Behav Pharmacol* 22: 655–662.
- Davis SF, Moore SA, Cowen CL, Thurson DK (1982). Defensive burying in the Mongolian gerbil (*Merionesun guiculatus*) as a function of size and shape of the test chamber. *Learn Behav* 10:516–520.
- De Boer SF, Koolhaas JM (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol* 463:145–161.
- Enna SJ (2007). The GABA receptors. In: Enna SJ, Möhler H, editors. *The GABA receptors*. Totawa: Humana Press. pp. 1–21.
- Fish EW, Sekinda M, Ferrari PF, Dirks A, Miczek KA (2000). Distress vocalizations in maternally separated mouse pups: modulation via 5-HT1A, 5-HT1B and GABAA receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 149:277–285.
- Fritschy JM, Sidler C, Parpan F, Gassmann M, Kaupmann K, Bettler B, Benke D (2004). Independent maturation of the GABAB receptor subunits GABAB1 and GABAB2 during postnatal development in rodent brain. *J Comp Neurol* 477:235–252.
- Frye CA, Walf AA (2002). Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm Behav* 41:306–315.

- García-Ríos RI, Rodríguez-Landa JF, Contreras CM (2013). Anxiolytic-like actions of fatty acids identified in human amniotic fluid. *Sci World J* **2013**:823289.
- Gutiérrez-García AG, Contreras CM, Mendoza-López MR, Cruz-Sánchez S, García-Barradas O, Rodríguez-Landa JF, Bernal-Morales B (2006). A single session of emotional stress produces anxiety in Wistar rats. *Behav Brain Res* **167**:30–35.
- Hsu FC, Zhang GJ, Raol YS, Valentino RJ, Coulter DA, Brooks-Kayal AR (2003). Repeated neonatal handling with maternal separation permanently alters hippocampal GABAA receptors and behavioral stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:12213–12218.
- Karabel M, Tan S, Tatli MM, Yilmaz AE, Tonbul A, Karadag A (2012). Separation anxiety disorder increases among neonatal intensive care unit graduates. *J Matern Fetal Neonatal Med* **25**:783–788.
- Kessler CR, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas RK, Walters EE (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* **62**:593–602, Erratum: **62**: 768.
- Kessler RC, Petukhova M, Sampson NA, Zaslavsky AM, Wittchen HU (2012). Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *Int J Methods Psychiatr Res* **21**: 169–184.
- Korte SM, de Boer SF (2003). A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* **463**: 163–175.
- López-Rubalcava C, Fernández-Guasti A, Urba-Holmgren R (1996). Age-dependent differences in the rat's conditioned defensive burying behavior: effect of 5-HT1A compounds. *Dev Psychobiol* **29**:157–169.
- Maggio JC, Harder DB (1983). Genotype and environment interactively determine the magnitude, directionality, and abolition of defensive burying in mice. *Learn Behav* **11**:162–172.
- Mason WA, Kosterman R, Hawkins JD, Herrenkohl TI, Lengua LJ, McCauley E (2004). Predicting depression, social phobia, and violence in early adulthood from childhood behavior problems. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **43**:307–315.
- Medina-Mora ME, Borges G, Benjet C, Lara C, Berglund P (2007). Psychiatric disorders in Mexico: lifetime prevalence in a nationally representative sample. *Br J Psychiatry* **190**:521–528.
- Naito H, Nakamura A, Inoue M (1998). Ontogenetic changes in responsiveness to benzodiazepine receptor ligands on ultrasonic vocalizations in rat pups. *Exp Anim* **47**:89–96.
- National Research Council (1996). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academy Press.
- NOM-062-ZOO-1999 (1999). *Technical specifications for production, care and use of lab animals*. Mexico: Sagarpa.
- Olvera-Hernández S, Fernández-Guasti A (2011). Sex differences in the burying behavior test in middle-age rats: effects of diazepam. *Pharmacol Biochem Behav* **99**:532–539.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* **14**:149–167.
- Pinel JP, Treit D (1978). Burying as a defensive response in rats. *J Comp Physiol Psychol* **92**:708–712.
- Pinel JP, Treit D, Ladak F, MacLennan AJ (1980). Conditioned defensive burying in rats free to escape. *Learn Behav* **8**:447–451.
- Pinel JP, Symons LA, Christensen BK, Tees RC (1989). Development of defensive burying in *Rattus norvegicus*: experience and defensive responses. *J Comp Psychol* **103**:359–365.
- Rodríguez-Manzo G, López-Rubalcava C, Fernández-Guasti A (1999). Anxiolytic-like effect of ejaculation under various sexual behavior conditions in the male rat. *Physiol Behav* **67**:651–657.
- Rowlett JK, Tornatzky W, Cook JM, Ma C, Miczek KA (2001). Zolpidem, triazolam, and diazepam decrease distress vocalizations in mouse pups: differential antagonism by flumazenil and  $\beta$ -carboline-3-carboxylate-*t*-butylester ( $\beta$ -CCT). *J Pharmacol Exp Ther* **297**:247–253.
- Shamir-Essakow G, Ungerer JA, Rapee RM (2005). Attachment, behavioral inhibition, and anxiety in preschool children. *J Abnorm Child Psychol* **33**:131–143.
- Simpson J, Ryan C, Curley A, Mulcaire J, Kelly JP (2012). Sex differences in baseline and drug-induced behavioural responses in classical behavioural tests. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **37**:227–236.
- Stein MB, Stein DJ (2008). Social anxiety disorder. *Lancet* **371**:1115–1125.
- Treit D, Pinel JP, Fibiger HC (1981). Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav* **15**:619–626.
- Treit D, Pinel JP (2005). Defensive burying. In: Whishaw IQ, Kolb B, editors. *The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests*. New York: Oxford University Press. pp. 353–362.
- Treit D, Engin E, McEown K (2010). Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. In: Stein MB, Steckler T, editors. *Behavioral neurobiology of anxiety and its treatment*. New York: Springer. pp. 121–160.
- Uusi-Oukari M, Korpi ER (2010). Regulation of GABAA receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol Rev* **62**:97–135.
- Vivian JA, Barros HM, Manitiu A, Miczek KA (1997). Ultrasonic vocalizations in rat pups: modulation at the  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor complex and the neurosteroid recognition site. *J Pharmacol Exp Ther* **282**:318–325.
- Wilson MA, Burghardt PR, Ford KA, Wilkinson MB, Primeaux SD (2004). Anxiolytic effects of diazepam and ethanol in two behavioral models: comparison of males and females. *Pharmacol Biochem Behav* **78**:445–458.

### APÉNDICE III

Rodríguez-Landa, J.F., García-Ríos, R.I., Cueto-Escobedo, J. Bernal-Morales, B. & Contreras, C.M. (2013) Participation of GABAA chloride channels in the anxiolytic like effects of a fatty acid mixture. *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 121794, 7 pages, doi:10.1155/2013/121794

## Research Article

# Participation of GABA<sub>A</sub> Chloride Channels in the Anxiolytic-Like Effects of a Fatty Acid Mixture

Juan Francisco Rodríguez-Landa,<sup>1</sup> Rosa Isela García-Ríos,<sup>1</sup> Jonathan Cueto-Escobedo,<sup>1</sup> Blandina Bernal-Morales,<sup>1</sup> and Carlos M. Contreras<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, 91190 Xalapa, VER, Mexico

<sup>2</sup> Unidad Periférica Xalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 91190 Xalapa, VER, Mexico

Correspondence should be addressed to Carlos M. Contreras; [ccontreras@uv.mx](mailto:ccontreras@uv.mx)

Received 4 April 2013; Accepted 20 August 2013

Academic Editor: Brynn Levy

Copyright © 2013 Juan Francisco Rodríguez-Landa et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Human amniotic fluid and a mixture of eight fatty acids (FAT-M) identified in this maternal fluid (C12:0, lauric acid, 0.9  $\mu\text{g}\%$ ; C14:0, myristic acid, 6.9  $\mu\text{g}\%$ ; C16:0, palmitic acid, 35.3  $\mu\text{g}\%$ ; C16:1, palmitoleic acid, 16.4  $\mu\text{g}\%$ ; C18:0, stearic acid, 8.5  $\mu\text{g}\%$ ; C18:1*cis*, oleic acid, 18.4  $\mu\text{g}\%$ ; C18:1*trans*, elaidic acid, 3.5  $\mu\text{g}\%$ ; C18:2, linoleic acid, 10.1  $\mu\text{g}\%$ ) produce anxiolytic-like effects that are comparable to diazepam in Wistar rats, suggesting the involvement of  $\gamma$ -aminobutyric acid-A (GABA<sub>A</sub>) receptors, a possibility not yet explored. Wistar rats were subjected to the defensive burying test, elevated plus maze, and open field test. In different groups, three GABA<sub>A</sub> receptor antagonists were administered 30 min before FAT-M administration, including the competitive GABA binding antagonist bicuculline (1 mg/kg), GABA<sub>A</sub> benzodiazepine antagonist flumazenil (5 mg/kg), and noncompetitive GABA<sub>A</sub> chloride channel antagonist picrotoxin (1 mg/kg). The FAT-M exerted anxiolytic-like effects in the defensive burying test and elevated plus maze, without affecting locomotor activity in the open field test. The GABA<sub>A</sub> antagonists alone did not produce significant changes in the behavioral tests. Picrotoxin but not bicuculline or flumazenil blocked the anxiolytic-like effect of the FAT-M. Based on the specific blocking action of picrotoxin on the effects of the FAT-M, we conclude that the FAT-M exerted its anxiolytic-like effects through GABA<sub>A</sub> receptor chloride channels.

## 1. Introduction

The  $\gamma$ -aminobutyric acid-A (GABA<sub>A</sub>) receptor is a heteropentameric structure that consists of several subunits with GABA, benzodiazepine, alcohol, barbiturate, and neurosteroid recognition sites [1]. The activation of GABA<sub>A</sub> receptors increases the intraneuronal concentration of chloride ions, leading to hyperpolarization, an action shared by anxiolytic, hypnotic, sedative, and anticonvulsant drugs [2]. Consequently, GABA<sub>A</sub> receptors are considered the main target for clinically effective anxiolytic drugs and some neurosteroids with potential anxiolytic properties [3, 4].

Several GABA<sub>A</sub> receptor antagonists, such as bicuculline, flumazenil, and picrotoxin, are currently used to identify the precise sites of action of drugs on the GABA<sub>A</sub> receptor. These antagonists are able to block the anxiolytic-like effects

of diazepam and some neurosteroids [1, 5, 6]. Their actions are well known. Bicuculline is a competitive antagonist of the GABA binding site and blocks the anxiolytic-like effects of 4'-chlorodiazepam and progesterone [7], among others. Flumazenil is a selective antagonist of the benzodiazepine allosteric binding site and blocks the anxiolytic-like effects of diazepam, alprazolam, and some neurosteroids [4, 8, 9]. Picrotoxin is a noncompetitive antagonist of GABA<sub>A</sub> receptor chloride channels and blocks the anxiolytic-like effects of diazepam, 4'-chlorodiazepam, progesterone, and allopregnanolone [3, 7, 10, 11], among others. Therefore, these antagonists constitute effective tools in the pharmacological screening of drugs that interact with GABA<sub>A</sub> receptors [12].

Recently it was demonstrated that human amniotic fluid and a mixture of eight fatty acids (FAT-M) contained therein produce anxiolytic-like effects similar to diazepam in male



and female adult Wistar rats [13]. The FAT-M included eight FATs (C12:0, lauric acid; C14:0, myristic acid; C16:0, palmitic acid; C16:1, palmitoleic acid; C18:0, stearic acid; C18:1*cis*, oleic acid; C18:1*trans*, elaidic acid; C18:2, linoleic acid) that were consistently detected in human amniotic fluid, colostrum, and milk. In addition to its anxiolytic effects [13], the FAT-M produced appetitive responses in human newborns [14]. The anxiolytic-like action of the FAT-M may involve the participation of GABA<sub>A</sub> receptors, given that some FATs modulate the opening of GABA<sub>A</sub> receptor chloride channels in vitro [15], but this possibility needs to be assayed in vivo.

Therefore, the present study confirmed the anxiolytic-like effect of a FAT-M using two validated experimental animal models currently used to test the effectiveness of clinically effective anxiolytics, the defensive burying test [16] and elevated plus maze [17]. We then explored the GABA<sub>A</sub> site of action involved in the anxiolytic-like effects of a FAT-M using bicuculline (a competitive antagonist of the GABA<sub>A</sub> receptor), flumazenil (a blocker of the benzodiazepine recognition site), and picrotoxin (a noncompetitive antagonist of chloride channels).

## 2. Material and Methods

**2.1. Ethics.** All of the experimental procedures in the present study followed the principles of animal care based on the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, [18]). The protocol received authorization from the Biomedical Research Institute Ethical Committee (Universidad Nacional Autónoma de México).

**2.2. Animals.** Male Wistar rats were obtained from a local strain supplied by Harlan (México City, México). They were housed in local housing facilities at a mean temperature of  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  with a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM). All of the rats included in the study were approximately 2 months old, weighed 250–300 g, and five to six rats were housed per cage in acrylic boxes (44 cm width  $\times$  33 cm length  $\times$  20 cm height) with ad libitum access to food (Teklad Lab Animal Diets; Harlan, Indianapolis, IN, USA) and purified water. All of the experiments were performed during the light period (approximately 12:00 PM).

### 2.3. Behavioral Tests

**2.3.1. Defensive Burying Test.** An acrylic box (27 cm width  $\times$  17.5 cm length  $\times$  30 cm height) with the floor covered by a 5 cm bed of fine sawdust (Teklad Sani-Chips 7090, 2.2 cubic feet; Harlan, Indianapolis, IN, USA) was placed inside a noise-isolated box (65 cm width  $\times$  55 cm length  $\times$  45 cm height; Coulbourn Instruments, Whitehall, PA, USA). An electrode (7 cm length, 0.5 cm diameter) protruded 2 cm above the sawdust bed horizontally from one wall of the box (17.5  $\times$  30 cm) [16, 19]. The electrode delivered a constant-intensity current (0.3 mA, direct current) through an electronic stimulator (Grass Instruments S44, Quincy, MA, USA) coupled in series to a stimulus isolation unit (Grass Instruments SIU5) and constant-current unit (Grass Instruments CCUIA). When a

rat incidentally touched the electrode, it received an electric shock and began to vigorously displace the sawdust to cover the electrode (burying behavior). All of the sessions were recorded with a digital videocamera (Sony, DCR-SR85, 25x optical zoom, Carl Zeiss lens) for subsequent analysis by two independent observers to measure burying latency and total cumulative burying time during a 10 min test, starting from the first electric shock. After each test session, the bed of fine sawdust was removed and replaced by clean sawdust bedding. Only observations with more than 95% agreement between observers were included in the data analysis.

**2.3.2. Elevated Plus Maze.** The apparatus was constructed of wood and situated in a brightly lit room (40 lux). The apparatus consisted of two opposite open and closed arms set in a perpendicular configuration. The open and closed arms were painted white and black, respectively. The dimensions of the open arms were 50 cm length  $\times$  10 cm width and the closed arms were 50 cm length  $\times$  10 cm width  $\times$  40 cm height. The entire maze was elevated 50 cm from the floor. The rats were placed in the center of the maze, facing an open arm, and the time spent on and number of entries into the open arms was recorded [20]. The total number of entries (open arms + closed arms) and percentage of open arm entries ((open entries)/(total entries)  $\times$  100) were calculated. The elevated plus maze was cleaned with a 5% ethanol solution after each session.

**2.3.3. Open Field Test.** To evaluate the effects of the treatments on spontaneous locomotor activity, which could interfere with performance in the defensive burying test and elevated plus maze, the rats were subjected to a 5 min test in the open field after the defensive burying and elevated plus maze tests. We used an automated motor activity monitor (Acti-Track v2.7.10, PanLab, S.L. Instrument, Barcelona, Spain) in a Perspex box (45  $\times$  45 cm base, 35 cm height). A total of 32 infrared beams, 16 each on perpendicular walls, were mounted 3 cm above the box frame floor and connected to an interface (LE 8811, LSI Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain), and the data were sent to a computer. For data analysis, the floor of the cage was virtually divided into five zones (four peripheral and one central). The total number of entries into the zones (i.e., crossings), time spent active, and time spent resting were recorded. Because of the relatively small cage, we did not compare central *versus* peripheral exploration.

After each experimental session, the open field was carefully cleaned and deodorized with a 5% ethanol cleaning solution. Five minutes elapsed between each test to allow the scent of the substances to dissipate.

**2.4. Pretreatment.** The doses and pretreatment schedules were based on previous reports [4, 7, 21] that effectively antagonized the behavioral effects produced by anxiolytic drugs: bicuculline, 1 mg/kg; flumazenil, 5 mg/kg; picrotoxin, 1 mg/kg. The antagonists were administered intraperitoneally in an equivalent volume of 1 mL/kg 30 min before the FAT-M treatment, including the vehicles.

We used two vehicles, one for the GABA<sub>A</sub> antagonists (vehicle-1: 1% Tween-80, 14% propylene glycol, and 85% saline) and another for the FAT-M (vehicle-2: 96% propylene glycol and 4% ethanol). All of the chemical compounds were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

**2.5. Treatment.** The FAT-M preparation and treatment schedule were based on previous reports [13]. The FAT-M consisted of lauric acid (0.4 mg), myristic acid (3.0 mg), palmitic acid (15.3 mg), palmitoleic acid (7.1 mg), stearic acid (3.7 mg), oleic acid (8.0 mg), elaidic acid (1.5 mg), and linoleic acid (4.4 mg) in 100 mL of vehicle-2 at a temperature <40°C. The FAT-M (1 mL/rat) or vehicle-2 was subcutaneously injected 60 min before the behavioral tests. Analytical-grade FATs were purchased from Sigma-Aldrich.

## 2.6. Experimental Groups

**2.6.1. Intrinsic Activity of GABA<sub>A</sub> Antagonists.** To identify the intrinsic activity of the GABA<sub>A</sub> antagonists on anxiety-like behavior and open field activity, four independent groups were evaluated in the defensive burying test and subsequently open field test. The treatment conditions included four combinations: vehicle-1 before vehicle-2 (vehicles;  $n = 11$ ), bicuculline before vehicle-2 (bicuculline;  $n = 12$ ), flumazenil before vehicle-2 (flumazenil;  $n = 12$ ), and picrotoxin before vehicle-2 (picrotoxin;  $n = 11$ ). Other four independent groups ( $n = 8$  rats per group) received a similar treatment schedule but were tested in the elevated plus maze and subsequently open field test.

**2.6.2. Interaction between GABA<sub>A</sub> Antagonists and FAT-M.** The defensive burying test included five independent groups that received five different combinations: vehicle-1 before vehicle-2 (vehicles;  $n = 11$ ), vehicle-1 before FAT-M (FAT-M;  $n = 15$ ), bicuculline before FAT-M (bicuculline + FAT-M;  $n = 11$ ), flumazenil before FAT-M (flumazenil + FAT-M;  $n = 11$ ), and picrotoxin before FAT-M (picrotoxin + FAT-M;  $n = 13$ ). The elevated plus maze test included another five independent groups ( $n = 8$  rats per group) that received similar treatments. The open field test was conducted less than 5 min after the elevated plus maze test.

**2.7. Statistical Analysis.** All of the data were statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). Values of  $P \leq 0.05$  were followed by the Student-Newman-Keuls *post hoc*. We first analyzed the intrinsic activity of GABA<sub>A</sub> antagonists on the variables in the behavioral tests. We then evaluated the effects of antagonism of different binding sites of the GABA<sub>A</sub> receptor on the effects of the FAT-M. The results are expressed as mean  $\pm$  standard error.

## 3. Results

**3.1. Intrinsic Activity of GABA<sub>A</sub> Antagonists.** The GABA<sub>A</sub> antagonists alone did not affect burying latency ( $F_{3,42} = 0.46$ ,  $P = 0.712$ ) or cumulative burying time ( $F_{3,42} = 0.11$ ,  $P = 0.958$ ) in the defensive burying test. The antagonists also did

not affect the number of crossings ( $F_{3,42} = 2.65$ ,  $P = 0.061$ ), activity time ( $F_{3,42} = 1.79$ ,  $P = 0.164$ ), or resting time ( $F_{3,42} = 2.33$ ,  $P = 0.088$ ) in the open field test. Likewise, the antagonists did not produce significant changes in the elevated plus maze, including the time spent in the open arms ( $F_{3,28} = 0.23$ ,  $P = 0.875$ ), number of entries into the open arms ( $F_{3,28} = 0.64$ ,  $P = 0.592$ ), total number of entries into the arms ( $F_{3,28} = 0.84$ ,  $P = 0.483$ ), and percentage of entries into the open arms ( $F_{3,28} = 0.88$ ,  $P = 0.462$ ). Similarly, no significant changes were found in the open field test, including the number of crossings ( $F_{3,28} = 1.61$ ,  $P = 0.208$ ), activity time ( $F_{3,28} = 2.19$ ,  $P = 0.111$ ), and resting time ( $F_{3,28} = 2.02$ ,  $P = 0.134$ ).

## 3.2. Interactions between GABA<sub>A</sub> Antagonists and FAT-M

**3.2.1. Defensive Burying Test.** The analysis of burying latency revealed significant differences between treatments ( $F_{4,56} = 3.45$ ,  $P = 0.014$ ). The *post hoc* test showed that burying latency was significantly longer in the FAT-M groups compared with the vehicle-1 + vehicle-2 group, but no significant differences were detected in the FAT-M groups pretreated with GABA<sub>A</sub> antagonists compared with the vehicle-1 + vehicle-2 group (Figure 1(a)).

The analysis of cumulative burying time also revealed significant differences between treatments ( $F_{4,56} = 10.80$ ,  $P = 0.001$ ). The *post hoc* test revealed that cumulative burying time was significantly shorter in the FAT-M, bicuculline + FAT-M, and flumazenil + FAT-M groups than in the vehicle-1 + vehicle-2 group. However, the picrotoxin + FAT-M group was not significantly different from the vehicle-1 + vehicle-2 group (Figure 1(b)).

**3.2.2. Elevated Plus Maze.** The analysis of the time spent in the open arms revealed significant differences between treatments ( $F_{4,35} = 8.47$ ,  $P = 0.001$ ). The *post hoc* test revealed that the time spent in the open arms was longer in the FAT-M, bicuculline + FAT-M, and flumazenil + FAT-M groups than in the vehicle-1 + vehicle-2 and picrotoxin + FAT-M groups, which displayed similar values (Figure 2(a)). The number of entries into the open arms was also significantly different ( $F_{4,35} = 3.66$ ,  $P = 0.014$ ). The *post hoc* test revealed that this variable was higher in the FAT-M, bicuculline + FAT-M, and flumazenil + FAT-M groups than in the vehicle-1 + vehicle-2 and picrotoxin + FAT-M groups (Figure 2(b)), but no significant differences between these latter two groups were detected.

The analysis of the percentage of entries into the open arms also revealed significant differences ( $F_{4,35} = 4.54$ ,  $P = 0.005$ ). The percentage of entries into the open arms was greater in the FAT-M, bicuculline + FAT-M, and flumazenil + FAT-M groups than in the vehicle-1 + vehicle-2 and picrotoxin + FAT-M groups (Figure 2(d)). No significant differences were found between the vehicle-1 + vehicle-2 and picrotoxin + FAT-M groups. Finally, the total entries into the arms were not significantly different between groups ( $F_{4,35} = 2.54$ ,  $P = 0.060$ ; Figure 2(c)).

TABLE 1: Open field test.

Group	Crossings	Activity time (s)	Resting time (s)
Vehicle-1 + Vehicle-2	21.8 ± 2.88	75.1 ± 7.05	221.9 ± 7.09
Vehicle-1 + FAT-M	37.5 ± 5.37	109.7 ± 8.82	194.8 ± 10.42
Bicuculline + FAT-M	36.0 ± 6.33	103.9 ± 8.73	201.3 ± 7.00
Flumazenil + FAT-M	38.1 ± 8.70	97.2 ± 14.56	184.0 ± 16.67
Picrotoxin + FAT-M	34.0 ± 7.63	90.3 ± 13.03	213.5 ± 13.87

No significant differences were found in the evaluated variables. The data are expressed as mean ± standard error. FAT-M, fatty acid mixture.

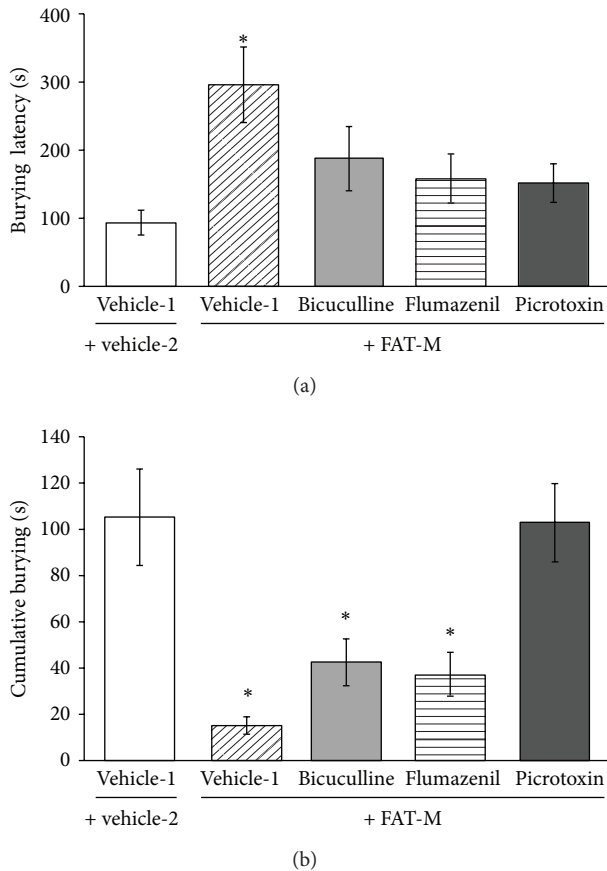


FIGURE 1: Defensive burying test. (a) Burying latency was significantly longer in the FAT-M group pretreated with vehicle-1, an effect attenuated by pretreatment with GABA<sub>A</sub> antagonists. (b) Cumulative burying time was significantly shorter in the vehicle-1 + FAT-M, bicuculline + FAT-M, and flumazenil + FAT-M groups than in the vehicle-1 + vehicle-2, an effect not detected in the picrotoxin + FAT-M group (\*  $P < 0.05$ , Student-Newman-Keuls *post hoc* test). FAT-M, fatty acid mixture.

**3.2.3. Open Field Test.** In the open field test, the analysis of the number of crossings did not reveal significant differences between treatments ( $F_{4,35} = 1.06$ ,  $P = 0.391$ ). Similarly, no significant differences were detected in activity time ( $F_{4,35} = 1.53$ ,  $P = 0.213$ ) or resting time ( $F_{4,35} = 1.65$ ,  $P = 0.183$ ; Table 1).

## 4. Discussion

The present study explored the participation of the GABA<sub>A</sub> receptor complex in the anxiolytic-like effects of a mixture of eight FATS in male Wistar rats subjected to the defensive burying test and elevated plus maze. Pretreatment with picrotoxin but not bicuculline or flumazenil blocked the anxiolytic-like effects of FAT-M, without affecting behavior in the open field test.

In the defensive burying test, the time that elapsed between the first shock and first attempt at burying (i.e., burying latency) is inversely related to the rat's reactivity. The time spent burying (i.e., total cumulative burying) is an indicator of anxiety as discussed by Treit [16]. "Anxious" animals spend more time burying than animals treated with anxiolytic drugs, such as diazepam, which spend less time burying. In the present study, the FAT-M reduced cumulative burying time and increased burying latency, confirming its anxiolytic-like effects, as previously reported [13].

The elevated plus maze is widely used to explore anxiety-like behavior and the anxiogenic- or anxiolytic-like effects of drugs [20]. Anxiety-like behavior in the elevated plus maze is assumed when both the percentage of entries into and time spent on the open arms are reduced. The present results showed that the FAT-M increased both the percentage of entries into and time spent on the open arms, confirming an anxiolytic-like effect in a second test of anxiety. This anxiolytic-like effect was only blocked by picrotoxin and not by the other GABA<sub>A</sub> receptor antagonists tested in the present study.

The present results suggest that GABA<sub>A</sub> receptor chloride ion channels, but not benzodiazepine or GABA binding sites, participate in the anxiolytic-like effects of the FAT-M. Certainly, some FATS (i.e., oleic, linoleic, ricinoleic, and arachidonic acids) seemingly participate in the regulation of chloride ion channels [22]. Interestingly, oleic and linoleic acids are components of the FAT-M tested in the present study. Oleic acid increases the affinity of agonists for the benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptors [23], thus modulating the opening of chloride channels. The modulation of ion channels by other FATS (e.g., myristic and arachidonic acids) occurs through indirect effects that involve their metabolic conversion to active oxygenated metabolites and other direct effects [24] by accumulating FATS in the phospholipid membrane bilayer and modifying membrane tension, leading to conformational changes in ion channels and altering ion conductance [25].

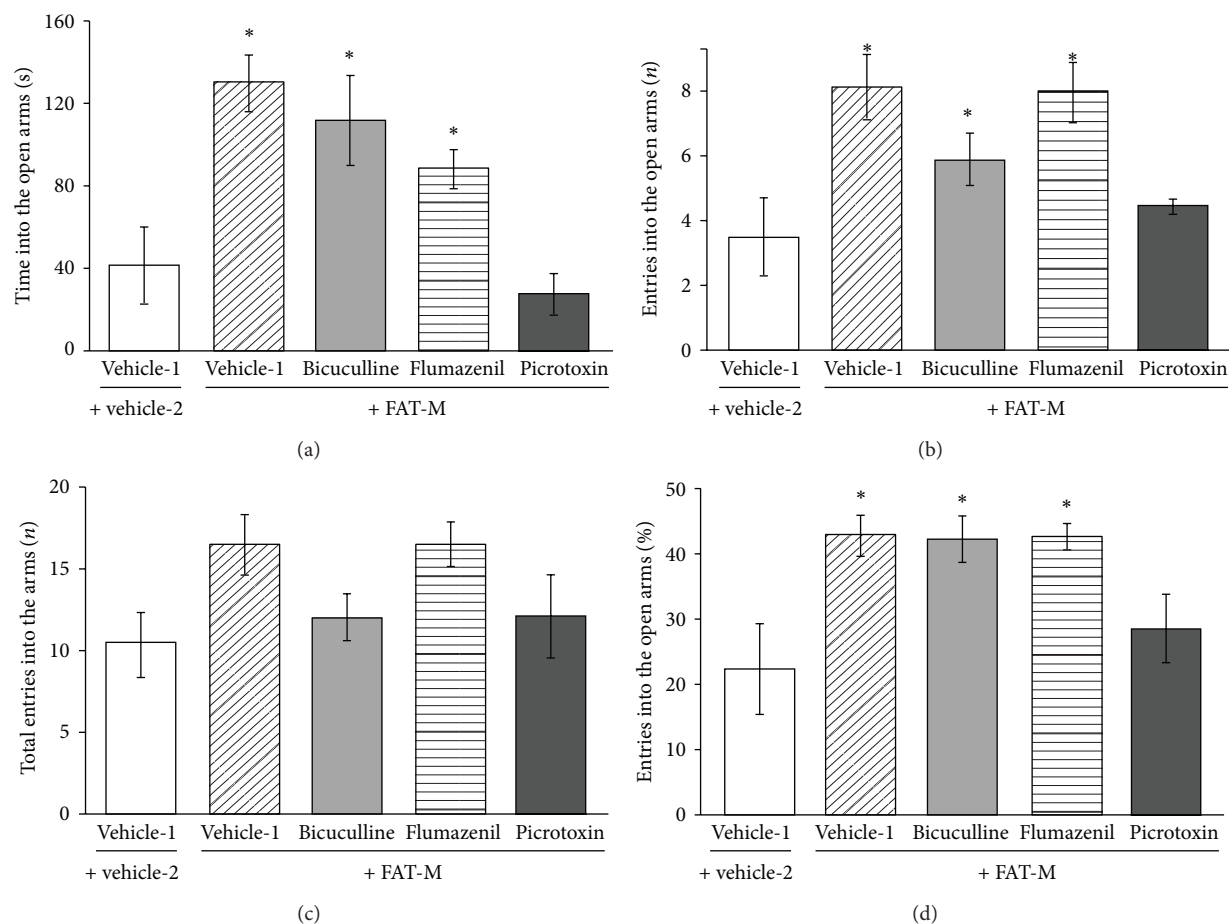


FIGURE 2: Elevated plus maze. The FAT-M produced anxiolytic-like effects that were blocked by pretreatment with picrotoxin. (a) Time spent in open arms. (b) Total number of entries into the arms. (c) Number of entries into the open arms. (d) Percentage of entries into the open arms. The elevated plus maze test lasted for 5 min. \*  $P < 0.05$ , compared with vehicle-1 + vehicle-2 and picrotoxin + FAT-M groups (Student-Newman-Keuls *post hoc* test). FAT-M, fatty acid mixture.

Chloride channels participate in the actions of substances with anxiolytic potency [26–28]. Other compounds that act on chloride channels produce similar anxiolytic-like effects as the FAT-M. Some endogenous steroids, as progesterone and allopregnanolone, are allosteric modulators of GABA<sub>A</sub> chloride ion channels [29–32]. At physiological (i.e., nanomolar) concentrations, some steroids with a reduced A-ring promote channel opening frequency and increase chloride flux [28, 33, 34]. Majewska [28] demonstrated that steroids interact at the membrane protein and lipid interface, leading to an increased frequency of chloride channel opening. In fact, the actions of neurosteroids resemble the actions of flunitrazepam, muscimol, and pentobarbital on chloride channel function and are blocked by the noncompetitive GABA antagonist picrotoxin [26], suggesting some similarity between neurosteroids and the FAT-M, given that they share common actions, such as anxiolytic-like effects in experimental models of anxiety that can be blocked by picrotoxin.

Finally, some drugs are able to produce nonspecific changes in spontaneous locomotor activity that may interfere with performance in the defensive burying test and

elevated plus maze. The open field test was conducted after the aforementioned behavioral tests, allowing us to exclude possible nonspecific locomotor effects of antagonists or FAT treatments. In the open field test, we found that none of the GABA<sub>A</sub> antagonists alone or the FAT-M at the doses tested produced any significant changes on motor activity, similar to previous reports [4, 11, 13, 35]. Additionally, the dose administered of bicuculline and picrotoxin did not produce behaviour linked to seizures (i.e., facial/ear twitching, myoclonic jerks, among others), which are detected with higher doses than those used in the present study. Therefore, the anxiolytic-like effect of the FAT-M and blockade of this effect by GABA<sub>A</sub> antagonists do not appear to be associated with nonspecific effects of the treatments on spontaneous locomotion.

A possible limitation of the present study was that the FAT-M was administered in addition to the rats' normal diet (i.e., purine), possibly providing an additional source of energy that may impact spontaneous behavior. However, we did not observe any change in locomotion associated with the FAT-M treatment, similar to previous reports [13, 36].

Although we did not directly assess the increased metabolic sources provided by the FATs, this may be considered inconsequential for interpreting the present results.

In conclusion, the anxiolytic-like effects of the FAT-M involved actions on GABA<sub>A</sub> receptors, specifically chloride channels, providing additional evidence of the anxiolytic-like effects of FATs and the possible site of action on GABA<sub>A</sub> receptor of the FAT-M used in the present study. However, the participation of other receptors linked to chloride ion channel (i.e., strychnine-sensitive glycine receptors) could not be discarded, which needs to be explored in particular studies.

## Conflicts of Interests

There is no conflicts of interests.

## Acknowledgments

This study was partially supported by a Grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT: CB-2006-1, 61741) and DGAPA-PAPIIT IN211111-3 from Universidad Nacional Autónoma de México, which did not participate in the study design, data collection, data analysis, interpretation of the data, writing of the paper, or decision to submit the paper for publication. R.I. García-Ríos and J. Cueto-Escobedo received fellowships from CONACyT (Reg. 203280 and 197556, resp.).

## References

- [1] J. Bormann, "The "ABC" of GABA receptors," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 21, no. 1, pp. 16–19, 2000.
- [2] S. J. Enna, "The GABA receptors," in *The GABA Receptors*, S. J. Enna and H. Möhler, Eds., pp. 1–22, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2007.
- [3] D. Bitran, M. Shiekh, and M. McLeod, "Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA<sub>A</sub> receptors," *Journal of Neuroendocrinology*, vol. 7, no. 3, pp. 171–177, 1995.
- [4] A. Fernández-Guasti and O. Picazo, "Flumazenil blocks the anxiolytic action of allopregnanolone," *European Journal of Pharmacology*, vol. 281, no. 1, pp. 113–115, 1995.
- [5] M. Farrant and R. A. Webster, "GABA antagonists, their use and mechanisms of action," in *Drugs as Tools in Neurotransmitter Research. Neuromethods*, A. A. Boulton, G. B. Baker, and A. V. Juorio, Eds., vol. 12, pp. 161–219, Humana Press, Clifton, NJ, USA, 1989.
- [6] M. Chebib and G. A. R. Johnston, "The "ABC" of GABA receptors: a brief review," *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 26, no. 11, pp. 937–940, 1999.
- [7] D. S. Reddy and S. K. Kulkarni, "Role of GABA<sub>A</sub> and mitochondrial diazepam binding inhibitor receptors in the anti stress activity of neurosteroids in mice," *Psychopharmacology*, vol. 128, no. 3, pp. 280–292, 1996.
- [8] C. López-Rubalcava, A. Saldivar, and A. Fernández-Guasti, "Interaction of GABA and serotonin in the anxiolytic action of diazepam and serotonergic anxiolytics," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 43, no. 2, pp. 433–440, 1992.
- [9] S. K. Kulkarni and K. Sharma, "Alprazolam modifies animal behaviour on elevated plus-maze," *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 31, no. 11, pp. 908–911, 1993.
- [10] D. Treit, J. P. J. Pinel, and H. C. Fibiger, "The inhibitory effect of diazepam on conditioned defensive burying is reversed by picrotoxin," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 17, no. 2, pp. 359–361, 1982.
- [11] D. Bitran, R. J. Hilvers, and C. K. Kellog, "Anxiolytic effects of 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ [ $\beta$ ]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABA<sub>A</sub> receptor," *Brain Research*, vol. 561, no. 1, pp. 157–161, 1991.
- [12] G. A. R. Johnston, "GABA<sub>A</sub> antagonists," *Seminars in Neuroscience*, vol. 3, no. 3, pp. 205–210, 1991.
- [13] C. M. Contreras, J. F. Rodríguez-Landa, A. G. Gutiérrez-García, M. R. Mendoza-López, R. I. García-Ríos, and J. Cueto-Escobedo, "Anxiolytic-like effects of human amniotic fluid and its fatty acids in Wistar rats," *Behavioural Pharmacology*, vol. 22, pp. 655–662, 2011.
- [14] C. M. Contreras, A. G. Gutiérrez-García, R. Mendoza-López, J. F. Rodríguez-Landa, B. Bernal-Morales, and C. Díaz-Martel, "Amniotic fluid elicits appetitive responses in human newborns: fatty acids and appetitive responses," *Developmental Psychobiology*, vol. 55, no. 3, pp. 221–231, 2013.
- [15] M. Samochocki and J. Strosznajder, "Modulatory action of arachidonic acid on GABA<sub>A</sub>/chloride channel receptor function in adult and aged brain cortex membranes," *Neurochemistry International*, vol. 23, no. 3, pp. 261–267, 1993.
- [16] D. Treit, "Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review," *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 9, no. 2, pp. 203–222, 1985.
- [17] G. Griebel, D. J. Sanger, and G. Perrault, "The use of the rat elevated plus-maze to discriminate between non-selective and BZ-1 ( $\omega$ 1) selective, benzodiazepine receptor ligands," *Psychopharmacology*, vol. 124, no. 3, pp. 245–254, 1996.
- [18] National Research Council, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Academy Press, Washington, DC, USA, 1985.
- [19] J. P. J. Pinel and D. Treit, "Burying as a defensive response in rats," *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, vol. 92, no. 4, pp. 708–712, 1978.
- [20] A. A. Walf and C. A. Frye, "The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents," *Nature Protocols*, vol. 2, no. 2, pp. 322–328, 2007.
- [21] K. Hirani, A. N. Sharma, N. S. Jain, R. R. Ugale, and C. T. Chopde, "Evaluation of GABAergic neuroactive steroid 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnane-20-one as a neurobiological substrate for the anti-anxiety effect of ethanol in rats," *Psychopharmacology*, vol. 180, no. 2, pp. 267–278, 2005.
- [22] T.-C. Hwang, S. E. Guggino, and W. B. Guggino, "Direct modulation of secretory chloride channels by arachidonic and other cis unsaturated fatty acids," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 15, pp. 5706–5709, 1990.
- [23] M. Nielsen, M.-R. Witt, and H. Thøgersen, "[<sup>3</sup>H]Diazepam specific binding to rat cortex in vitro is enhanced by oleic, arachidonic and docosahexenoic acid isolated from pig brain," *European Journal of Pharmacology*, vol. 146, no. 2-3, pp. 349–353, 1988.
- [24] R. W. Ordway, J. J. Singer, and J. V. Walsh Jr., "Direct regulation of ion channels by fatty acids," *Trends in Neurosciences*, vol. 14, no. 3, pp. 96–100, 1991.

- [25] A. Leaf, Y.-F. Xiao, and J. X. Kang, "Interactions of n-3 fatty acids with ion channels in excitable tissues," *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 67, no. 2-3, pp. 113–120, 2002.
- [26] M. D. Majewska, N. L. Harrison, R. D. Schwartz, J. L. Barker, and S. M. Paul, "Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor," *Science*, vol. 232, no. 4753, pp. 1004–1007, 1986.
- [27] K. W. Gee, M. B. Bolger, R. E. Brinton, H. Coirini, and B. S. McEwen, "Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 246, no. 2, pp. 803–812, 1988.
- [28] M. D. Majewska, "Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. Mechanism of action and physiological significance," *Progress in Neurobiology*, vol. 38, no. 4, pp. 379–395, 1992.
- [29] N. L. Harrison and M. A. Simmonds, "Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic," *Brain Research*, vol. 323, no. 2, pp. 287–292, 1984.
- [30] M. D. Majewska, J.-C. Bisslerbe, and R. L. Eskay, "Glucocorticoids are modulators of GABA<sub>A</sub> receptors in brain," *Brain Research*, vol. 339, no. 1, pp. 178–182, 1985.
- [31] A. M. Hosie, M. E. Wilkins, H. M. A. Da Silva, and T. G. Smart, "Endogenous neurosteroids regulate GABA<sub>A</sub> receptors through two discrete transmembrane sites," *Nature*, vol. 444, no. 7118, pp. 486–489, 2006.
- [32] I. Ferando and I. Mody, "GABA<sub>A</sub> receptor modulation by neurosteroids in models of temporal lobe epilepsies," *Epilepsia*, vol. 9, pp. 89–101, 2012.
- [33] N. L. Harrison, M. D. Majewska, J. W. Harrington, and J. L. Barker, "Structure-activity relationships for steroid interaction with the  $\gamma$ -aminobutyric acid(A) receptor complex," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 241, no. 1, pp. 346–353, 1987.
- [34] T. G. Kokate, B. E. Svensson, and M. A. Rogawski, "Anticonvulsant activity of neurosteroids: correlation with  $\gamma$ -aminobutyric acid-evoked chloride current potentiation," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 270, no. 3, pp. 1223–1229, 1994.
- [35] M. Herrera-Ruiz, A. González-Carranza, A. Zamilpa, E. Jiménez-Ferrer, M. Huerta-Reyes, and V. M. Navarro-García, "The standardized extract of *Loeselia mexicana* possesses anxiolytic activity through the  $\gamma$ -amino butyric acid mechanism," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 138, no. 2, pp. 261–267, 2011.
- [36] I. Morganstern, Z. Ye, S. Liang, S. Fagan, and S. F. Leibowitz, "Involvement of cholinergic mechanisms in the behavioral effects of dietary fat consumption," *Brain Research*, vol. 1470, pp. 24–34, 2012.

#### APÉNDICE IV

Contreras CM1, 2, Cueto-Escobedo J1, Bernal-Morales B1, Guillén-Ruiz G1, Rodríguez-Landa JF1. Fatty acids from human amniotic fluid reduce anxiety-like behaviors of infantile rats (Behavioural pharmacology 2014. en arbitraje).

# Behavioural Pharmacology

## Fatty acids from human amniotic fluid reduce anxiety-like behavior in infant rats.

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Fatty acids from human amniotic fluid reduce anxiety-like behavior in infant rats.
<b>Article Type:</b>	Research Report
<b>Keywords:</b>	anxiolytic; defensive burying; diazepam; elevated plus maze; fatty acids; infantile anxiety.
<b>Corresponding Author:</b>	Carlos M. Contreras, DrSci Laboratorio de Neurofarmacología, Unidad Periférica Xalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz MEXICO
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Laboratorio de Neurofarmacología, Unidad Periférica Xalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana.
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Carlos M. Contreras, DrSci
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Carlos M. Contreras, DrSci Jonathan Cueto-Escobedo, MSci Blandina Bernal-Morales, PhD Gabriel Guillén-Ruiz, MSci Juan F. Rodríguez-Landa, PhD
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Manuscript Region of Origin:</b>	MEXICO
<b>Abstract:</b>	<p>In mammals, some behavioral and chemical signals establish a link between pups and parents that initiates the establishment of useful coping strategies but may also constitute a protective role against stress. Some fatty acids are consistently present in human amniotic fluid, colostrum, and maternal milk and produce anxiolytic-like effects in adult Wistar rats in experimental models of anxiety. However, whether this anxiolytic-like action of fatty acids is also detectable in infant rats is unknown. The present study assessed the effect of a mixture of eight fatty acids contained in maternal-infant fluids in the elevated plus maze, defensive burying test, and open field test in Wistar rats on postnatal day 28, with diazepam as a positive control. Similar to diazepam, the fatty acid mixture significantly increased the frequency of entries into and time spent on the open arms in the elevated plus maze and increased the burying latency and decreased cumulative burying in the defensive burying test, without producing changes in spontaneous locomotion. These results suggest that fatty acids contained in maternal fluid exert anxiolytic-like effects that may act as a protective factor against stress during prenatal and early postnatal life.</p>



## **Fatty acids from human amniotic fluid reduce anxiety-like behavior in infant rats**

**Carlos M. Contreras,<sup>a, b</sup> Jonathan Cueto-Escobedo,<sup>a</sup> Blandina Bernal-Morales,<sup>a</sup> Gabriel Guillén-Ruiz,<sup>a</sup> Juan F. Rodríguez-Landa<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología,  
Universidad Veracruzana, México.

<sup>b</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Short title: Fatty acids and anxiety

\*Corresponding author:

Dr. Carlos M. Contreras

Tel: +52 (228) 8418900, ext. 13613

Fax: +52 (228) 8418918

Email: ccontreras@uv.mx; contreras@biomedicas.unam.mx

Funding source: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT: CB-2006-1, 61741), Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-PAPIIT IN211111-3), Universidad Veracruzana (Programa de Fortalecimiento Académico del Posgrado de Alta Calidad I010/458/2013, C-703/2013)

Conflict of interest: There are no conflicts of interest.

## **ABSTRACT**

In mammals, some behavioral and chemical signals establish a link between pups and parents that initiates the establishment of useful coping strategies but may also constitute a protective role against stress. Some fatty acids are consistently present in human amniotic fluid, colostrum, and maternal milk and produce anxiolytic-like effects in adult Wistar rats in experimental models of anxiety. However, whether this anxiolytic-like action of fatty acids is also detectable in infant rats is unknown. The present study assessed the effect of a mixture of eight fatty acids contained in maternal-infant fluids in the elevated plus maze, defensive burying test, and open field test in Wistar rats on postnatal day 28, with diazepam as a positive control. Similar to diazepam, the fatty acid mixture significantly increased the frequency of entries into and time spent on the open arms in the elevated plus maze and increased the burying latency and decreased cumulative burying in the defensive burying test, without producing changes in spontaneous locomotion. These results suggest that fatty acids contained in maternal fluid exert anxiolytic-like effects that may act as a protective factor against stress during prenatal and early postnatal life.

**Keywords:** anxiolytic, defensive burying, diazepam, elevated plus maze, fatty acids, infantile anxiety

## Introduction

Anxiety is a disabling emotional disorder characterized by exaggerated and inappropriate behavioral and physiological responses when facing a stressful stimulus (American Psychiatric Association, 2000). It can be diagnosed during infancy (2-7 years), with some symptom variations, and its severity and duration increase later in life (Shamir-Essakow *et al.*, 2005; Kessler *et al.*, 2005; Rockhill *et al.*, 2010). The onset of childhood anxiety may be related to stressful life events, such as prenatal stress (Davis and Sandman, 2012) and abuse during infancy (Afifi *et al.*, 2012). For example, rearing in neonatal intensive care units increases the risk for the development of separation anxiety disorder (Karabel *et al.*, 2012). In animal models, some mechanical and chemical stimuli from the dam are able to promote useful emotional responses in the rat (Meaney, 2001). Human newborns who detect the smell of amniotic fluid exhibit a reduction of crying when the mother is absent (Schaal and Marlier, 1998).

The amniotic fluid, colostrum, and milk of pigs (*Sus scrofa*) contain fatty acids that produce a calming effect in piglets, reflected by decreases in the number of fighting bouts and wounds. When these fatty acids are spread on the walls around human children, they produce relaxing and calming effects (Pageat, 2001). Human maternal-infant fluids contain various fatty acids, including lauric acid, myristic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, elaidic acid, and linoleic acid, that produce orientating feeding responses in human newborns (Contreras *et al.*, 2013). In adult Wistar rats, an artificially prepared mixture of these fatty acids (FAT-M), with similar amounts and proportions as those found in human amniotic fluid, increases exploration of the open arms of the elevated plus maze and

decreases cumulative burying in the defensive burying test, suggesting an anxiolytic-like effect (Contreras *et al.*, 2011).

Still unknown, however, is whether the anxiolytic effects of the FAT-M reported in adult rats (12-16 weeks) can be observed shortly after weaning (at 3 weeks) in rats. If so, then the fatty acids contained in maternal fluids may act as a protective factor against early stress. The aim of the present study was to explore the action of a FAT-M in Wistar rats on postnatal day 28 using two validated models of experimental anxiety: the elevated plus maze (Pellow *et al.*, 1985) and defensive burying test (Treit *et al.*, 1981; de Boer and Koolhaas, 2003; Wilson *et al.*, 2004), with diazepam as an active control. For the defensive burying test, we use a round chamber that was previously found to be useful for detecting the anxiolytic-like effects of diazepam in infant rats (Cueto-Escobedo *et al.*, 2013).

## **Methods**

### *Ethics*

All of the experimental procedures in the present study followed the principles of animal care based on the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996) and Mexican law requirements (NOM-062-ZOO-1999, 1999). The experimental protocol received authorization from the Biomedical Research Institute Ethical Committee of the National Autonomous University of México (UNAM).

### *Animals*

The experiments included inbred Wistar rats provided by the Biomedical Research Institute, UNAM. During gestation and after delivery,

each dam and its litter of ~10 pups remained allocated to acrylic boxes (44 × 33 cm base, 20 cm height) under a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) with free access to water and food. The nest remained as undisturbed as possible, and the dams and pups were minimally handled when changing the bedding material (every 48 h). The offspring were weaned on postnatal day 21 and allocated to six to eight animals per cage (44 × 33 cm base, 20 cm height) following random assignment to the experimental groups, taking care to include not more than three subjects from the same litter in the same experimental group.

### *Elevated plus maze*

The apparatus was constructed of wood and situated in a brightly lit room (40 lux). It consisted of two opposite open and closed arms set in a perpendicular configuration, elevated 50 cm from the room's floor. The floor of the open and closed arms (50 cm length × 10 cm width) was painted white and black, respectively, and the closed arms had black-painted walls (40 cm height). The test began by gently placing the rats in the center of the maze, facing an open arm. Rats that fell or jumped outside the arm were excluded from the statistical analysis. We recorded the number of entries into and time spent on the open arms (Walf and Frye, 2007) and total number of entries (open arms + closed arms). In the same 5-min test, we evaluated the number of and time spent engaged in two risk assessment measures according to Griebel *et al.* (1996). The first risk assessment measure (*i.e.*, attempt) was defined as any attempt to enter the open arms followed by avoidance responses, including stretch attend posture (*i.e.*, the rat stretches forward and retracts to its original position). The second risk assessment

measure (*i.e.*, head-dipping) was defined as the rat protruding its head over the ledge of an open arm and down toward the floor.

At the end of each individual test, the device was cleaned with a 5% ethanol solution, and at least 10 min elapsed before the next test to allow the scents to disperse.

### *Defensive burying test*

A round chamber (19 cm diameter, 283.5 cm<sup>2</sup> floor area) was placed in a sound-isolated box (55 × 40 × 46 cm; Coulbourn Instruments, Whitehall, PA, USA). Wood chips (Teklad Sani Chips 7990, 2 mm diameter; Harlan, Madison, WI, USA) covered the floor (2 cm) and were changed at the end of each test. The rats were individually and gently placed far from a metal prod (7 cm length) placed 0.5 cm above the wood chip surface. When the rat eventually touched the prod, it received a direct electrical current (0.1 mA) delivered by an electronic stimulator (Grass Instruments S44, Quincy, MA, USA) coupled in series to a stimulus isolation unit (SIU5, Grass Instruments, Quincy, MA, USA) and a constant-current generator (CCUIA, Grass Instruments, Quincy, MA, USA). After the rat touched the prod, the latency to bury it and cumulative burying time were assessed in a 10-min session. Each test was video-recorded and later scored by at least two observers. The statistical analysis of the data only included 95% agreement between two independent observers. For data interpretation, burying latency was considered an indicator of reactivity when an animal copes with stressful stimuli (Rodríguez-Manzo *et al.*, 1999), and cumulative burying time was considered an indicator of anxiety-like behavior (Pinel and Treit, 1978; Barret, 1991).

### *Open field test*

Approximately 3 min after the elevated plus maze test, each rat was placed in a locomotor activity monitor (Leticia model LE 8811; Panlab S.L., Barcelona, Spain) that consisted of a black Perspex base (44 × 45 cm) with four transparent Perspex walls (36 cm height). Each test lasted 5 min. General locomotor activity was automatically recorded by infrared detectors and data analysis software (Acti-Track v2.7.10; Panlab S.L., Barcelona, Spain). For the data analysis, we measured the total number of locomotion events, distance traveled, and number of rearings. The tests were performed between 11:00 AM and 3:00 PM. Only animals subjected to the elevated plus maze were tested in the open field because of the lower likelihood of stress caused by this test compared with receiving an electric shock in the defensive burying test.

### *Treatments*

Fatty acid mixture. The FAT-M included fatty acids that were analytical-grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and based on the fatty acid amounts and concentrations measured in human amniotic fluid (Contreras *et al.*, 2011). The FAT-M consisted of lauric acid (0.4 mg), myristic acid (3.0 mg), palmitic acid (15.3 mg), palmitoleic acid (7.1 mg), stearic acid (3.7 mg), oleic acid (8.0 mg), elaidic acid (1.5 mg), and linoleic acid (4.4 mg).

Vehicle. The FAT-M was obtained by dissolving in 100 ml of vehicle at a temperature < 40°C. The vehicle consisted of propylene glycol (96%) and ethanol (4%) and was injected subcutaneously at a dose of 1 ml/300 g per rat.

Diazepam. Diazepam (Valium 10) was used as an active control drug (Hoffman-Roche, Basel, Switzerland) and injected intraperitoneally at a dose of 1 mg/kg.

### *Regimens*

The vehicle or FAT-M was administered 24, 5, and 1 h before the behavioral tests. Diazepam was administered 60 min before the tests based on previous studies in infant rats (Naito *et al.*, 1998; Cueto-Escobedo *et al.*, 2013) and adult rats (Contreras *et al.*, 2011; Rodríguez-Landa *et al.*, 2013).

### *Experimental groups*

The elevated plus maze included three groups: vehicle ( $n = 12$ ), FAT-M ( $n = 19$ ), and diazepam ( $n = 17$ ). Another set of rats was assigned to three experimental groups and received the same drug treatments but was tested in the defensive burying test: vehicle ( $n = 19$ ), FAT-M ( $n = 19$ ), and diazepam ( $n = 19$ ).

### *Statistical analysis*

We used one-way analysis of variance (ANOVA) to analyze the effects of the treatments, followed by the Student-Newman-Keuls *post hoc* test. Values of  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant. In cases of nonparametric distributions of the data, we used the Kruskal-Wallis test. The results are expressed as mean  $\pm$  SE.

## **Results**

### *Elevated plus maze*



The pharmacological treatments significantly affected the exploration time on the open arms ( $F_{2,47} = 4.068, p < 0.02$ ). The *post hoc* analysis showed a longer time spent on the open arms in the groups that received the FAT-M and diazepam ( $p < 0.05$ ) compared with the vehicle group (Fig. 1a). The treatments produced significant effects on the number of entries into the open arm ( $F_{2,47} = 6.930, p < 0.002$ ). The *post hoc* analysis indicated that the FAT-M and diazepam significantly increased ( $p < 0.05$ ) the number of entries compared with vehicle (Fig. 1b). The analysis of the total number of entries showed a significant effect of treatment ( $F_{2,47} = 8.268, p < 0.001$ ). The FAT-M and diazepam groups exhibited a higher number of total entries ( $p < 0.05$ ) than the vehicle group (Fig. 1c).

Insert Figure 1

With regard to risk assessment behavior, significant differences were found in the time engaged in attempts ( $F_{2,47} = 4.637, p < 0.01$ ) but not the number of attempts. Significant differences were found in the number of head-dipping events ( $F_{2,47} = 4.152, p < 0.02$ ) but not in the time spent engaged in head-dipping. The *post hoc* test showed that the FAT-M and diazepam groups had a shorter time spent engaged in attempts ( $p < 0.05$ ) and a higher number of head-dipping events ( $p < 0.05$ ) compared with the vehicle group (Fig. 2a, b).

Insert Figure 2

*Defensive burying test*

The FAT-M and diazepam groups displayed a significantly longer burying latency ( $p < 0.020$ , Kruskal-Wallis test), which was approximately 30% longer than the vehicle group (Fig. 3a). The cumulative burying time was also significantly different ( $p < 0.016$ , Kruskal-Wallis test). The FAT-M and diazepam groups had an approximately 50% shorter cumulative burying time than the vehicle group (Fig. 3b).

Insert Figure 3

#### *Locomotor activity*

The treatments did not modify activity in the open field, including locomotion ( $F_{2,47} = 0.0657$ ,  $p = 0.937$ ), distance traveled ( $F_{2,47} = 0.0733$ ,  $p = 0.929$ ), and rearing ( $F_{2,47} = 0.970$ ,  $p = 0.487$ ; Table 1).

Insert Table 1

#### **Discussion**

The present study explored the anxiolytic-like effects of a FAT-M in Wistar rats in the elevated plus maze and defensive burying test on postnatal day 28. Similar to diazepam, the FAT-M increased the time spent on and number of entries into the open arms of the elevated plus maze compared with vehicle. In the defensive burying test, the same treatments increased the burying latency and reduced cumulative burying, with an absence of changes in general locomotor activity in the open field test.

The elevated plus maze is a validated model for measuring anxiogenic- and anxiolytic-like effects in adult rats (Walf and Frye, 2007). This test

explores an innate behavior that consists of aversion to open illuminated spaces and heights. The model has also been used in young rats (Imhof *et al.*, 1993; Estanislau and Morato, 2006; Hefner and Holmes, 2007; Lynn and Brown, 2010). Anxiolytic drugs usually increase the number of entries into and time spent on the open arms (Pellow *et al.*, 1985; Hogg, 1996; Varty *et al.*, 2002; Walf and Frye, 2007). The FAT-M produced some changes in risk assessment behaviors in the present study and significantly increased the number of entries into and time spent on the open arms. All of these changes were similar to those of diazepam and not attributable to changes in locomotor activity (*i.e.*, a typical effect of anxiolytic drugs; Walf and Frye, 2007).

In the defensive burying test, the burying latency is an indicator of the animal's reactivity to the aversive stimulus that the prod represents. Short latencies and long burying times are indicators of greater reactivity and an anxiety-like state. Anxiolytic drugs increase the burying latency and decrease cumulative burying (Treit, 1985a, b; de Boer and Koolhaas, 2003; Wilson *et al.*, 2004). The FAT-M, similar to diazepam, effectively produced a longer burying latency and shorter cumulative burying compared with vehicle, illustrating an anxiolytic action of the FAT-M and suggesting some similarity between the actions of the FAT-M and diazepam.

Diazepam exerts its anxiolytic effect by acting on  $\gamma$ -aminobutyric acid-A (GABA<sub>A</sub>) receptors (Enna, 2007). In the present study, the effects of the FAT-M resembled those of diazepam, thus suggesting the participation of GABA<sub>A</sub> receptors. The function of GABA<sub>A</sub> receptors in mammals during development has been explored (Vivian *et al.*, 1997; Gambarana *et al.*, 1990; Frosthalm *et al.*, 1992; Hutcheon *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006; Kalanjati *et al.*, 2011). The

effects of GABA on neuronal excitability and the effects of GABA receptor antagonists can be observed beginning on postnatal day 13 in rats (Sakuma *et al.*, 1996). In infant rats (3-12 days postnatal), diazepam reduces ultrasonic vocalizations, considered an anxiety-like behavior (Naito *et al.*, 1998). In adult rats, the anxiolytic actions of the FAT-M are seemingly produced with the participation of GABA<sub>A</sub> receptor chloride channels (Rodríguez-Landa *et al.*, 2013), suggesting that the anxiolytic-like actions of the FAT-M in infant rats may follow a similar involvement of GABA<sub>A</sub> receptors, but this possibility requires further study.

During uterine life and the early stages of development, protective factors against stress may exist. For example, 11- $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase in the placenta metabolizes maternal cortisol, preventing its crossing into amniotic fluid (Yang, 1997). After birth, parental care regulates the emotional fear responses and anxiety through the epigenetic regulation of GABA<sub>A</sub> receptors in rat pups (Caldji *et al.*, 1998, 2003) and humans (Grant *et al.*, 2010a, b; Monk *et al.*, 2012). Therefore, we conclude that fatty acids present in human amniotic fluid, colostrum, and maternal milk could act as a chemical protective factor against stress during infancy or even during intrauterine life.

### **Conflicts of interest**

There are no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

The authors thank Michael Arends for revising and editing the English of this manuscript. This study was partially supported by a grant from the

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT: CB-2006-1, 61741), DGAPA-PAPIIT IN211111-3 from Universidad Nacional Autónoma de México, UVE-CA-25 from Universidad Veracruzana, and IO10/458/2013, C-703/2013 from Programa de Fortalecimiento Académico del Posgrado de Alta Calidad, who did not participate in the study design, data collection, data analysis, interpretation of the data, writing of the manuscript, or decision to submit the paper for publication. JC-E and GG-R received fellowships from CONACyT (Reg. 197556 and 249708, respectively).

## References

- Afifi TO, Mota NP, Dasiewicz P, MacMillan, HL, Sareen J (2012). Physical punishment and mental disorders: results from a nationally representative US sample. *Pediatrics* **130**:184-92.
- American Psychiatric Association (2000). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press.
- Barret JE (1991). Animal behavior models in the analysis and understanding of anxiolytic drugs acting at serotonin receptors. In: *Animal Models in Psychopharmacology* (series title: *Advances in Pharmacological Sciences*). Olivier B, Moss J, Slangen JL (editors). Basel: Birkhauser Verlag; pp. 137-55.
- Caldji C, Diorio J, Meaney MJ (2003). Variations in maternal care alter GABA<sub>A</sub> receptor subunit expression in brain regions associated with fear. *Neuropsychopharmacology* **28**:1950-9.
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural

- systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:5335-40.
- Contreras CM, Gutiérrez-García AG, Mendoza-López R, Rodríguez-Landa JF, Bernal-Morales B, Díaz-Martínez C (2013). Amniotic fluid elicits appetitive responses in human newborns: fatty acids and appetitive responses. *Dev Psychobiol* **55**:221-31.
- Contreras CM, Rodríguez-Landa JF, Gutiérrez-García AG, Mendoza-López MR, García-Ríos RI, Cueto-Escobedo J (2011). Anxiolytic-like effects of human amniotic fluid and its fatty acids in Wistar rats. *Behav Pharmacol* **22**:655-62.
- Cueto-Escobedo J, Contreras CM, Bernal-Morales B, Guillén-Ruiz G, Rodríguez-Landa JF (2013). Defensive burying test in postweaning rats: utility of a small round chamber. *Behav Pharmacol* **24**:693-8.
- Davis EP, Sandman CA (2012). Prenatal psychobiological predictors of anxiety risk in preadolescent children. *Psychoneuroendocrinology* **7**:1224-33.
- de Boer SF, Koolhaas JM (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol* **463**:145-61.
- Enna SJ (2007). The GABA receptors. In: *The GABA Receptors*. Enna SJ, Möhler H (editors). Totowa: Humana Press; pp. 1-21.
- Estanislau C, Morato S (2006). Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects. *Int J Dev Neurosci* **24**:255-62.
- Frostholm A, Zdilar D, Luntz-Leybman V, Janapati V, Rotter A (1992). Ontogeny of GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor subunit mRNAs in the murine inferior olive: transient appearance of  $\beta$ 3 subunit mRNA and [<sup>3</sup>H] muscimol binding sites. *Brain Res Mol Brain Res* **16**:246-54.

- Gambarana C, Pittman R, Seigel RE (1990). Developmental expression of the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 1 subunit mRNA in the rat brain. *J Neurobiol* **21**:1169-79.
- Grant KA, McMahon C, Reilly N, Austin MP (2010a). Maternal sensitivity moderates the impact of prenatal anxiety disorder on infant mental development. *Early Hum Dev* **86**:551-6.
- Grant KA, McMahon C, Reilly N, Austin MP (2010b). Maternal sensitivity moderates the impact of prenatal anxiety disorder on infant responses to the still-face procedure. *Infant Behav Dev* **33**:453-62.
- Griebel G, Sanger D, Perrault G (1996). The use of the rat elevated plus-maze to discriminate between non-selective and Bz-1 ( $\omega$ 1) selective, benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacology (Berl)* **124**:245-54.
- Hefner K, Holmes A (2007). Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* **176**:210-5.
- Hogg S (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* **54**:21-30.
- Hutcheon B, Fritschy JM, Poulter MO (2004). Organization of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ -subunit clustering in the developing rat neocortex and hippocampus. *Eur J Neurosci* **19**:2475-87.
- Imhof JT, Coelho ZM, Schmitt ML, Morato GS, Carobrez AP (1993). Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behav Brain Res* **56**:177-80.

- Kalanjati VP, Miller SM, Ireland Z, Colditz PB, Bjorkman ST (2011). Developmental expression and distribution of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_1$ -,  $\alpha_3$ - and  $\beta_2$ -subunits in pig brain. *Dev Neurosci* **33**:99-109.
- Karabel M, Tan S, Tatli MM, Yilmaz AE, Tonbul A, Karadag A (2012). Separation anxiety disorder increases among neonatal intensive care unit graduates. *J Matern Fetal Neonatal Med* **25**:783-788.
- Kessler CR, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas RK, Walters EE (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* **62**:593-602 [erratum: **62**:768].
- Lynn DA, Brown GR (2010). The ontogeny of anxiety-like behavior in rats from adolescence to adulthood. *Dev Psychobiol* **52**:731-9.
- Meaney MJ (2001). Maternal care, gene expression and the transmission of individual differences on stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* **24**:1161-92.
- Monk C, Spicer J, Champagne FA (2012). Linking prenatal maternal adversity to developmental outcomes in infants: the role of epigenetic pathways. *Dev Psychopathol* **24**:1361-76.
- Naito H, Nakamura A, Inoue M (1998). Ontogenetic changes in responsiveness to benzodiazepine receptor ligands on ultrasonic vocalizations in rat pups. *Exp Anim* **47**:89-96.
- National Research Council (1996). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academy Press.
- NOM-062-ZOO-1999 (1999). *Technical Specifications for Production, Care and Use of Lab Animals*. México: SAGARPA.



- Pageat P (2001). Pig appeasing pheromones to decrease stress, anxiety and aggressiveness. United States Patent No. 6,169,113.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* **14**:149-67.
- Pinel JP, Treit D (1978). Burying as a defensive response in rats. *J Comp Physiol Psychol* **92**:708-12.
- Rockhill C, Kodish I, DiBattisto C, Macias M, Varley C, Ryan S (2010). Anxiety disorders in children and adolescents. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* **40**:66-99.
- Rodríguez-Landa JF, García-Ríos RI, Cueto-Escobedo J, Bernal-Morales B, Contreras CM (2013). Participation of GABA<sub>A</sub> chloride channels in the anxiolytic like effects of a fatty acid mixture. *Biomed Res Int* vol. **2013**:121794.
- Rodriguez-Manzo G, López-Rubalcaba C, Fernández-Guasti A (1999). Anxiolytic like effect of ejaculation under various sexual behavior conditions in the male rat. *Physiol Behav* **67**:651-7.
- Sakuma J, Ciporen J, Abrahams J, Young W (1996). Independent depressive mechanisms of GABA and (±)-8-hydroxy-dipropylaminotetralin hydrobromide on young rat spinal axons. *Neuroscience* **75**:927-38.
- Schaal B, Marlier L (1998). Maternal and paternal perception of individual odor signatures in human amniotic fluid: potential role in early bonding? *Biol Neonate* **74**:266-73.
- Shamir-Essakow G, Ungerer JA, Rapee RM (2005). Attachment, behavioral inhibition, and anxiety in preschool children. *J Abnorm Child Psychol* **33**:131-43.

- Treit D (1985a). Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci Biobehav Rev* **9**:203-22.
- Treit D (1985b). The inhibitory effect of diazepam on defensive burying: anxiolytic vs. analgesic effects. *Pharmacol Biochem Behav* **22**:47-52.
- Treit D, Pinel JP, Fibiger HC (1981). Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav* **15**:619-26.
- Varty GB, Morgan CA, Cohen-Williams ME, Coffin VL, Carey GJ (2002). The gerbil elevated plus-maze: I. Behavioral characterization and pharmacological validation. *Neurosyndromatology* **27**:357-70.
- Vivian JA, Barros HM, Manitiu A, Miczek KA (1997). Ultrasonic vocalizations in rat pups: modulation at the  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor complex and the neurosteroid recognition site. *J Pharmacol Exp Ther* **282**:318-25.
- Walf AA, Frye CA (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* **2**:322-8.
- Wilson MA, Burghardt PR, Ford KA, Wilkinson MB, Primeaux SD (2004). Anxiolytic effects of diazepam and ethanol in two behavioral models: comparison of males and females. *Pharmacol Biochem Behav* **78**:445-58.
- Yang K (1997). Placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: barrier to maternal glucocorticoids. *Rev Reprod* **2**:129-32.
- Yu ZY, Wang W, Fritschy JM, Witte OW, Redecker C (2006). Changes in neocortical and hippocampal GABA<sub>A</sub> receptor subunit distribution during brain maturation and aging. *Brain Res* **1099**:73-81.

## Figure Legends

**Figure 1.** Elevated plus maze. Similar to diazepam, the FAT-M increased the (a) time spent on and (b) number of entries into the open arms. (c) The FAT-M and diazepam increased the total number of entries into both the open and closed arms compared with vehicle ( $*p < 0.05$ , compared with vehicle; Student-Newman-Keuls). Veh, vehicle; FAT-M, fatty acid mixture.

**Figure 2.** Risk assessment behavior in the elevated plus maze. The FAT-M and diazepam (a) decreased the time engaged in attempts and (b) increased the number of head-dipping events compared with vehicle ( $*p < 0.05$ , compared with vehicle; Student-Newman-Keuls). Veh, vehicle; FAT-M, fatty acid mixture.

**Figure 3.** Defensive burying test. The FAT-M and diazepam (a) increased burying latency and (b) decreased cumulative burying ( $*p < 0.016$ , compared with vehicle; Kruskal-Wallis). Veh, vehicle; FAT-M, fatty acid mixture.

January 29, 2014

Prof. Paul Willner, D.Sc.  
Editor  
*Behavioural Pharmacology*

Dear Prof. Willner:

**We are submitting our manuscript**, “Fatty acids from human amniotic fluid reduce anxiety-like behavior in infant rats,” for consideration in *Behavioural Pharmacology*.

All of the coauthors actively participated in the study and fully revised the manuscript. We certify that this work is not under simultaneous consideration by any other journal. All of the authors have given their consent for submission. The authors report no biomedical financial interest or potential conflicts of interest, and we have no commercial associations that impacted this work.

The protocol was approved by the Ethical Committee for Animal and Human Experimentation of the Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico (UNAM) and in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 80-23, revised 1996).

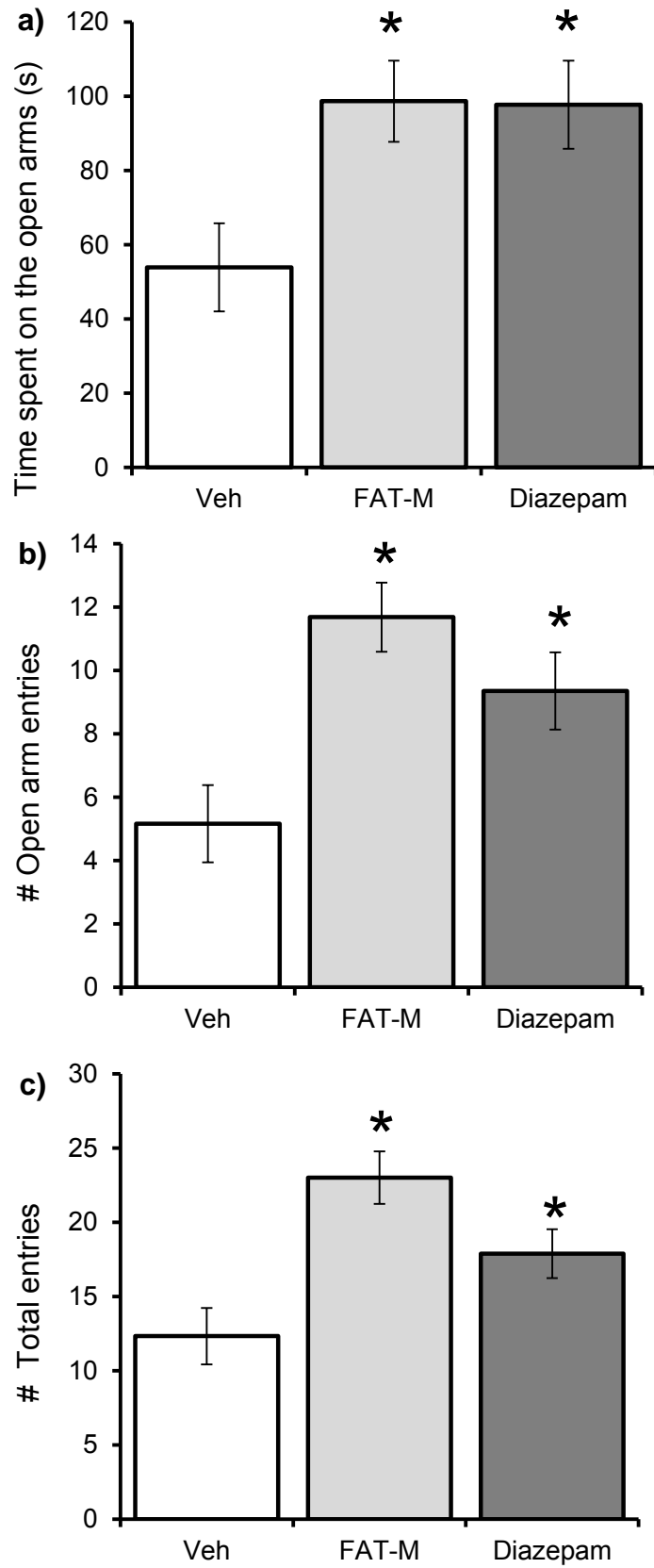
We believe that this study will be of interest to the readers of *Behavioural Pharmacology* because we found that a mixture of eight fatty acids found in human amniotic fluid, colostrum, and maternal milk may act as a chemical protective factor against stress during infancy. The artificial fatty acid mixture produced anxiolytic-like effects similar to diazepam in rats on postnatal day 28.

Thank you very much for your consideration.

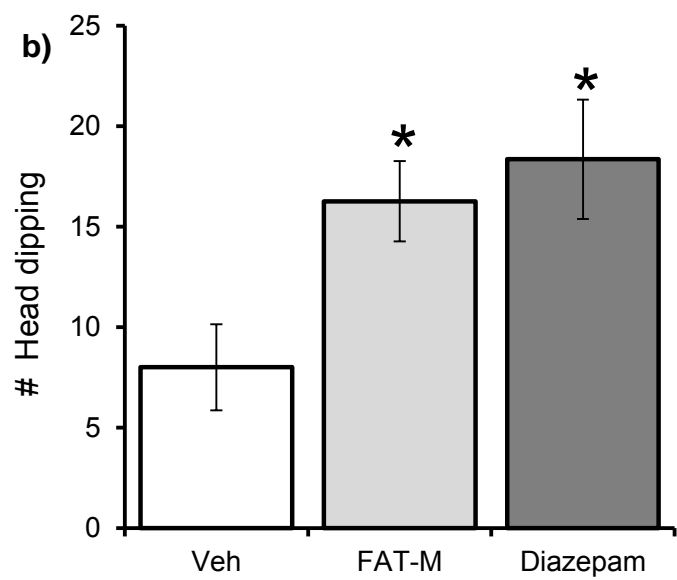
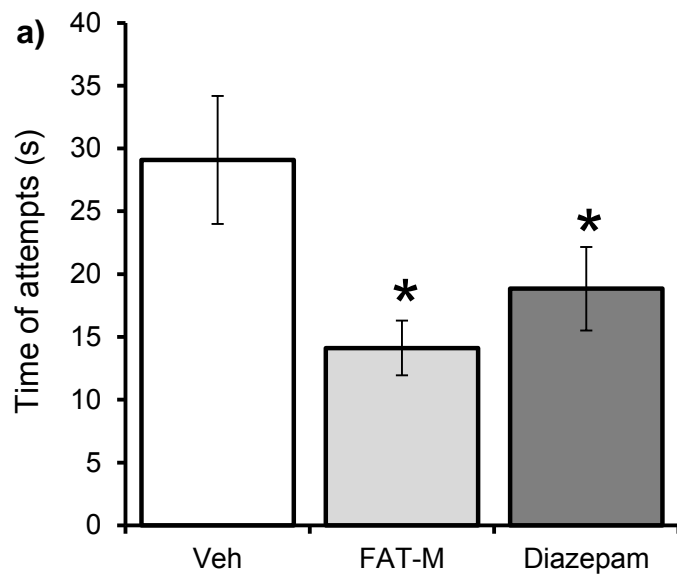
Best regards,

Dr. Carlos M. Contreras  
Laboratorio de Neurofarmacología  
Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Veracruzana e Instituto de Neuroetología  
Xalapa, Veracruz, México  
E-mail: [ccontreras@uv.mx](mailto:ccontreras@uv.mx); [contreras@biomedicas.unam.mx](mailto:contreras@biomedicas.unam.mx)

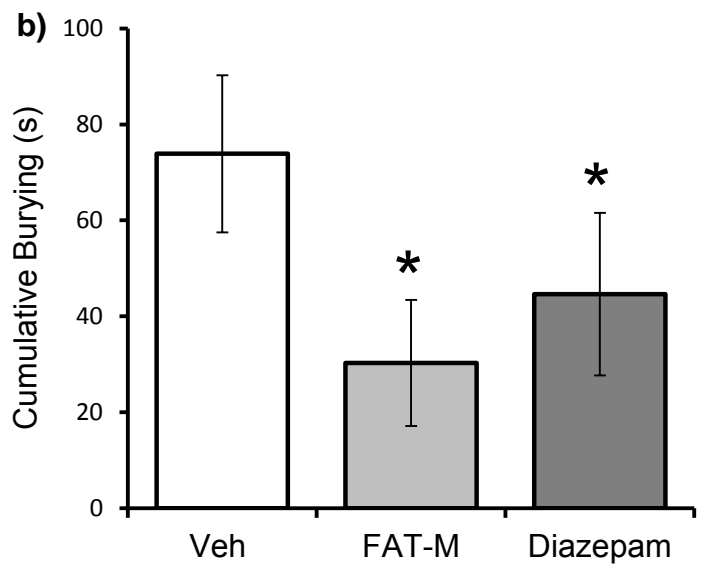
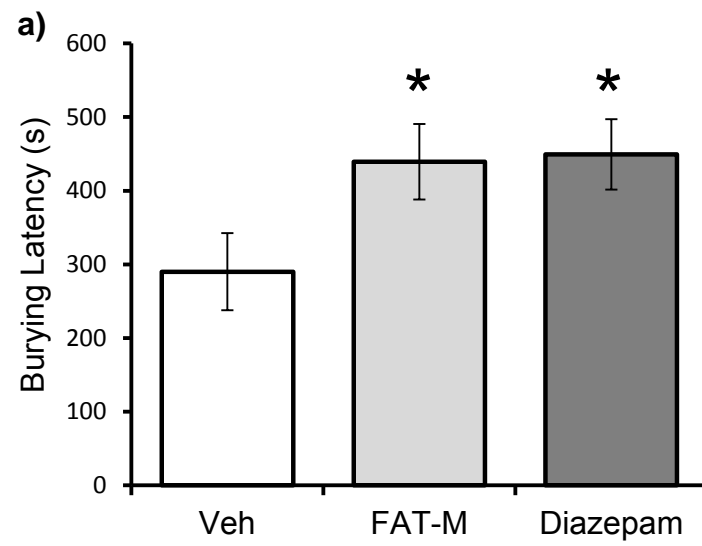
Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**



**Table 1.** Locomotor activity.

	Vehicle	FAT-M	Diazepam
Locomotion ( <i>n</i> )	690.5 ± 73.8	722.5 ± 56.4	722.9 ± 71.4
Distance (meters)	13.7 ± 1.9	14.3 ± 1.5	14.3 ± 2.0
Rearing ( <i>n</i> )	20.0 ± 3.5	28.6 ± 4.5	26.3 ± 3.8

Vehicle, 96% propylene glycol/4% ethanol; FAT-M, fatty acid mixture. The data are expressed as mean ± SEM.