



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**ANÁLISIS FARMACOLÓGICO DE LA SUPRESIÓN DE LA CONDUCTA DE
ENTERRAMIENTO EN RATAS SOMETIDAS A ESTRÉS CRÓNICO Y UN
CHOQUE ELÉCTRICO EN LAS PATAS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

ANALLELY ORTIZ PEÑA

DIRECTOR: DR. JOSÉ ALFREDO SALDÍVAR GONZÁLEZ

REVISOR: DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO

SINODO:

DR. ANTONIO PAULINO ZAINOS ROSALES

DR. OSCAR ZAMORA ARÉVALO

DR. CÉSAR CASASOLA CASTRO



MÉXICO, DF. 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis padres

Jesús Ortiz Herrera

Beltani Peña Santiago

Al Dr. Jesús Gutiérrez Aguilar
In memoriam

Agradecimientos

A mis padres, por la familia que me han brindado, por su amor, apoyo y confianza incondicional. No existen palabras con las que pueda agradecer por su esfuerzo y dedicación para conmigo. He visto a lo largo de mi vida todo lo que han dado y hecho por mi, gracias a ustedes, gracias porque son parte de mis logros. Gracias por alentarme a conseguir lo que quiero y a ser mejor cada día y a cada paso. Gracias por todo su esfuerzo.

A mis hermanos, que me han acompañado a lo largo de la vida, por apoyarme y estar conmigo. Gracias por ser mi familia.

A Mariana que me acompañó a lo largo de la carrera, de la tesis y la titulación. Gracias por esta amistad tan valiosa, por tanto amor y apoyo. Gracias por tanta dedicación, entusiasmo y esfuerzo para culminar este trabajo.

A Emilio, que me ha brindado su amor y su apoyo. Gracias por alentarme a ser mejor cada día, por impulsarme a hacer cosas maravillosas. Gracias por ser mi compañero.

A Oriana y Vicente, por hacer del laboratorio un lugar tan agradable. Gracias por su apoyo, paciencia y cariño tan sincero.

Al Dr. Saldivar, quién me abrió las puertas de su laboratorio. Gracias por compartir su vasto conocimiento, por su paciencia y entusiasmo en la investigación. Gracias por su confianza, apoyo y compromiso incondicional.

Gracias a todos los que hicieron posible este momento: profesores, compañeros, amigos y familiares. Gracias por coincidir.

ABREVIATURAS

Conducta de Enterramiento: CE

Diazepam: Dz

Fluoxetina: Fl

Hacinamiento: Hac

Imipramina: Imi

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ESTRÉS	5
ANSIEDAD	9
TRASTORNOS DE ANSIEDAD	10
FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA ANSIEDAD	13
MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA ANSIEDAD.....	17
MODELO DE ENTERRAMIENTO DEFENSIVO	18
MODELO DE ESTRÉS CRÓNICO (HACINAMIENTO).....	19
MODELO DE ESTRÉS AGUDO (<i>FOOT SHOCK</i>).....	19
JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS GENERALES:	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	22
MATERIAL Y MÉTODO	23
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
RESULTADOS.....	30
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS	68

RESUMEN

La ansiedad se define como un estado caracterizado por síntomas somáticos y psicológicos (miedo e incertidumbre acerca del futuro, taquicardia, sudoración). En la actualidad se desconocen algunos de los mecanismos que participan en la mediación de este padecimiento, por lo que, su estudio resulta relevante debido a sus implicaciones clínicas y teóricas. Con este propósito, se han usado modelos animales. En algunos de ellos se estudia el efecto de fármacos sobre respuestas conductuales que tal vez, constituyen formas adaptativas de contender con estímulos extraordinarios del ambiente. El modelo basado en el estudio de la conducta de enterramiento (CE) defensivo en ratas se ha usado para el estudio de la ansiedad y para el desarrollo de fármacos capaces de combatir los síntomas de la ansiedad. Se ha descrito que la administración de ansiolíticos reduce la expresión de la CE. El presente estudio se llevó a cabo con la finalidad de estudiar el efecto farmacológico de la administración vía oral de diazepam (Dz), imipramina (Imi) y fluoxetina (CF) sobre la CE observada en ratas sometidas a diez días de hacinamiento más la administración de un choque eléctrico de 0.7 mA. Se observó que la administración de imipramina por vía oral (VO) (10, 20 y 30 mg/kg), diazepam (1, 3 y 5 mg/kg), ambos durante 5 días, y fluoxetina (10, 20 y 30 mg/kg) durante 10 días, restituye la CE en los individuos sometidos a la inducción crónica (hacinamiento) y aguda (choque eléctrico) de ansiedad. Tanto la administración de diazepam como de fluoxetina, reduce la CE en sujetos no sometidos a la inducción de ansiedad aguda o crónica, así como en los grupos que inicialmente muestran incremento en la CE inducido por el hacinamiento y el choque eléctrico. Los resultados del presente estudio sugieren que la combinación de hacinamiento y choque eléctrico induce una respuesta conductual que refleja condición de enfermedad. El doble efecto de Dz refleja la posibilidad de estados conformacionales del receptor GABA/Bz relacionados con actividad inhibitoria o excitatoria. Además se discute la participación de receptores serotoninérgicos tipo 2_A. Se propone la utilidad de este diseño experimental para el análisis de la neurobiología y la farmacología de la ansiedad.

Palabras clave: Ansiedad, conducta de enterramiento y fármacos.

INTRODUCCIÓN

El estrés es un estado en el que se rompe el equilibrio homeostático y se producen alteraciones fisiológicas prominentes acompañadas de cambios patológicos en el organismo, dependiendo de la severidad, el tipo y la duración del estrés que se presente (Ravindran, Rathinaswamy, Samson y Senthilvelan, 2005). La exposición a condiciones hostiles (estresores), produce en el sujeto un conjunto de respuestas coordinadas y organizadas orientadas a mejorar la probabilidad de supervivencia (significado adaptativo) (Gonzalo y Van de Kar, 2003).

El estrés y la ansiedad no son muy diferentes uno del otro, sin embargo se debe hacer distinción al referirse a uno u otro. El estrés es un estado en el que se rompe la homeostasis, por lo que se desencadenan reacciones en el cuerpo para hacer frente a él. El sostenimiento de esta respuesta conduce al desarrollo de diferentes trastornos psicológicos, la ansiedad es uno de estos trastornos (Jaggi, Bhatia, Kumar, Singh, Anand y Dhawan, 2011). Sin embargo, los síntomas físicos de los trastornos de ansiedad son causados por la liberación de hormonas del estrés, como la adrenalina y el cortisol, los cuales, tienen efecto en casi todos los órganos del cuerpo (Kumar, Bhat y Kumar, 2013).

El estrés comienza con un estímulo de origen interno o externo del organismo, que activa el eje hipotalámico-hipófisis-suprarrenal (HHS) y el sistema nervioso simpático (SNS) (McEwen, 2000). Esta activación da como resultado un cambio fisiológico compensatorio o adaptación, de modo que el organismo puede hacer frente a la amenaza. Los cambios fisiológicos asociados con el estrés comprenden la movilización y conservación de energía para mantener la función cerebral y muscular; agudizando y centrando la atención en la amenaza percibida. Se incrementa la tasa de perfusión cerebral y la utilización de glucosa cerebral de forma local, se presenta un mayor rendimiento cardiovascular, redistribución del flujo sanguíneo y una modulación del sistema inmune (Gadek-Michalska y Bugajski, 2003; Galvao, Coimbra, Kawakami, Tufika y Schecki, 2009; Glaser y

Kiecolt-Glaser, 2005). La activación del eje HHS conduce a la generación de los glucocorticoides y catecolaminas, en conjunto llamadas las “hormonas del estrés” (McKlveen, Wyers, Flak, Bundzikova, Solomon *et al.*, 2013).

Se sabe que el hipocampo constituye una zona cerebral fuertemente relacionada con la mediación de respuestas asociadas con el estrés en mamíferos (Warner-Schmidt y Duman, 2006). Además, se ha postulado, a partir de modelos de Alzheimer y otras demencias, que el deterioro del aprendizaje y la memoria ocurren por cambios celulares y moleculares en el hipocampo, estos cambios correlacionan con modificaciones en los sistemas noradrenérgicos y serotoninérgicos. La alteración en la proliferación y diferenciación de células progenitoras neuronales, la neurogénesis, juega un rol importante en este sentido (Calabrese, Molteni, Racagni y Riva, 2009; Leal-Galicia, Saldívar-González, Sumiko-Morimoto y Arias, 2006). Específicamente, el déficit serotoninérgico conduce a la disminución de la neurogénesis hipocampal debido a las modificaciones que produce en los receptores de serotonina presentes en las células precursoras hipocampales (Marcussen, Flagstad, Kristjansen, Johansen y Englund, 2008).

Es importante señalar que el estrés produce estrés oxidante, moléculas altamente inestables (radicales libres) que se acoplan ávidamente con fosfolípidos de la membrana neuronal y del material génico nuclear y citoplásmico (Roth, Zoladz, Sweatt y Diamond, 2011). Estudios *in vivo* han demostrado que la administración de diazepam disminuye la excitabilidad en neuronas hipocampales de ratas adultas, reduciendo la demanda de energía, restaurando la homeostasis y la función cerebral (Galeffi, Sah, Pond, George y Schwartz, 2004). Esta evidencia demuestra que el estrés está relacionado con aspectos de la fisiología neuronal y ofrece una explicación acerca de cómo el estrés participa en la degeneración y muerte neuronal (Calderón-Guzmán, Juárez-Olguín, Hernández-García, Osnaya-Brizuela, Rivera-Espinosa y Saldívar González, 2014).

La eficacia conocida de las benzodiazepinas y su acción rápida, así como su buena tolerancia, les convierte en un medio terapéutico seguro a corto plazo. El inconveniente surge en los tratamientos a largo plazo, en los que se puede presentar dependencia, síndrome de abstinencia, alteración en la coordinación motora y en el funcionamiento cognitivo (Koen y Stein, 2011). Por lo que el desarrollo de nuevas sustancias útiles en el tratamiento de la ansiedad, que permitan disponer de fármacos más seguros y eficaces es una necesidad de primer orden. Los modelos animales pueden proporcionar el grado de control experimental necesario para llevar a cabo la investigación, que permita conocer la neurobiología de la ansiedad y por consiguiente desarrollar nuevas estrategias para su tratamiento.

ESTRÉS

DEFINICIÓN

Nuestro entorno dinámico nos expone regularmente a desafíos potencialmente mortales y estresantes. Para responder a estos desafíos y mantener la homeostasis, se inicia la respuesta al estrés: una participación coordinada innata de los sistemas neuronales centrales y periféricos (Valentino y Van Bockstaele, 2014). El estrés es un estado en el que se rompe la homeostasis y en el que se producen alteraciones fisiológicas así como cambios patológicos en el organismo, dependiendo de la severidad, tipo y duración del estrés que se presente (Ravindran *et al.*, 2005). La exposición a condiciones hostiles (estresores) se traduce en una serie de respuestas coordinadas y organizadas con la finalidad de mejorar la probabilidad de supervivencia del organismo (Gonzalo *et al.*, 2003). La función de estos cambios es hacer frente a una situación adversa o inesperada (Steimer, 2011).

La respuesta al estrés se caracteriza por un conjunto sincronizado de respuestas endocrinas, inmunológicas, autonómicas, conductuales y cognitivas a las amenazas percibidas. Evidentemente, la respuesta al estrés es necesaria para la supervivencia y se ha conservado durante la evolución. (Valentino *et al.*, 2014). Los cambios fisiológicos asociados con el estrés comprenden la movilización de energía para mantener la función cerebral y muscular; agudizando y centrando la atención en la amenaza percibida. Se incrementa la tasa de perfusión cerebral y la utilización de glucosa cerebral de forma local, se presenta un mayor rendimiento cardiovascular, redistribución del flujo sanguíneo y una modulación del sistema inmune (Gadek-Michalska y Bugajski, 2003; Galvao *et al.*, 2009; Glaser y Kiecolt-Glaser, 2005).

Durante la respuesta al estrés se presenta:

- Conducta de evitación (Zannas, y West, 2014).
- Aumento de la alerta y la vigilancia.
- Activación de la división simpática del Sistema Nervioso Autónomo
- Liberación de cortisol por las glándulas adrenales (Zhang, Zhong, Wang y Ru, 2015).

El estrés comienza con un estímulo de origen interno o externo del organismo, que activa el eje hipotalámico-hipófisis-suprarrenal (HHS) y el sistema nervioso simpático (SNS) (Geronikolou, Chamakou, Mantzou, Chrousos y Kanaka-Gantenbein, 2015). Esta activación da como resultado un cambio fisiológico compensatorio o adaptación, de modo que el organismo puede hacer frente a la amenaza. La activación del eje HHS y el SNS conduce a la generación de los glucocorticoides y de catecolaminas, en conjunto, llamadas “hormonas del estrés” (Vaessen, Hernaes, Myin-Germeys y Amelsvoort, 2015). Estos glucocorticoides inhiben la actividad del eje HHS por un mecanismo de retroalimentación, mediante la unión a sus receptores presentes en la glándula hipófisis, el hipotálamo y la corteza prefrontal medial (McKlveen *et al.*, 2013).

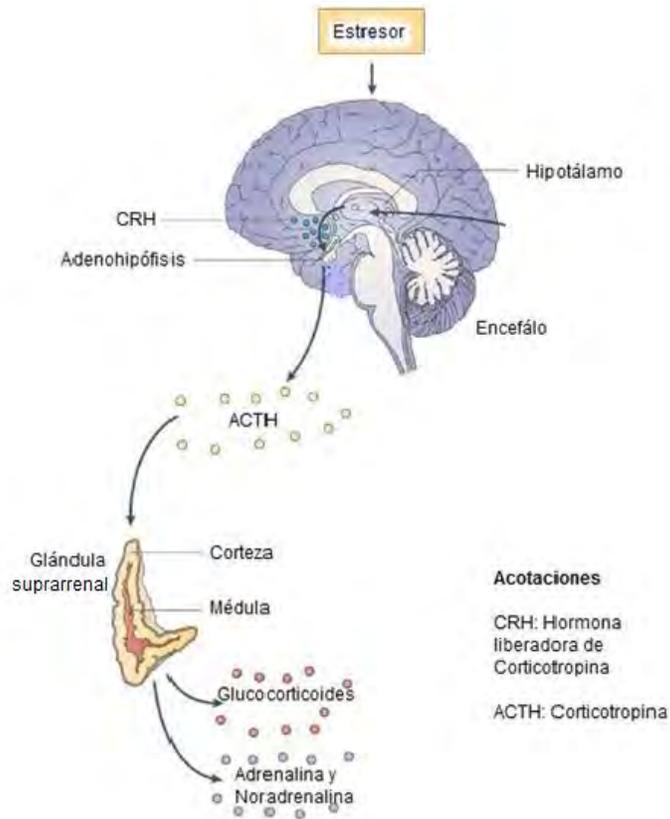


Imagen 1: Eje Hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenal. La respuesta humoral está mediada por el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HHS). El eje HHS regula la secreción de cortisol desde la glándula suprarrenal en respuesta al estrés. La hormona liberadora de corticotropina (HLC) es el mensajero químico entre el núcleo paraventricular del hipotálamo y la hipófisis (específicamente la adenohipófisis). La corticotropina (ACTH) liberada por la hipófisis se desplaza por el corriente circulatorio hasta la glándula suprarrenal que se encuentra sobre el riñón, donde estimula la liberación de cortisol. El cortisol contribuye a la respuesta conductual del organismo frente al estrés. La glándula suprarrenal también libera adrenalina, que tiene un efecto intenso sobre la tasa cardíaca y metabólica, además de noradrenalina, cuyo papel primario consiste en mantener la presión arterial (Campbell y Reece, 2007).

La iniciación inapropiada de la respuesta al estrés o su continuación después de que la situación estresante ha terminado, tiene consecuencias patológicas que se han relacionado con diversas enfermedades (Valentino *et al.*, 2014). Específicamente, el estrés es un importante factor de riesgo ambiental para el desarrollo de los trastornos del estado de ánimo y de ansiedad (Hunter y McEwen, 2013). Actualmente, se cree que los glucocorticoides inducen cambios de conducta no adaptativos, a través de su acción en la vía mineralocorticoide; se plantea además que esta acción es producto también de un estado de desequilibrio de los receptores a glucocorticoides (De Kloet, 2003). Se propone que este desequilibrio afecta vías que subyacen a la emoción, y que todas estas acciones, en conjunto, tienen como producto la depresión y la ansiedad (Baranyi, Bakos y Haller, 2005). La comprensión de los mecanismos neurobiológicos por los que el estrés se traduce en la psicopatología es esencial para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de los trastornos afectivos.

ANSIEDAD

El estado emocional de “ansiedad” es universal y tiene una función adaptativa importante. Se describe como una combinación de síntomas somáticos y síntomas subjetivos (Chagas, Nardi, Manfro, Hetem, Andrada, Levitan *et al.*, 2010). La definición de la ansiedad en sí es compleja, ya que incluye síntomas somáticos (como el aumento de la sudoración, ritmo cardíaco elevado, temblores, hiperventilación) y síntomas subjetivos (como pensamientos recurrentes sobre una situación de miedo o imaginación de eventos catastróficos que podrían ocurrir en el futuro) (Belo, Constantino, Ribeiro, Reimer, Lira, De Matis *et al.*, 2012).

Algunos autores se han referido a la ansiedad como un estado patológico, en realidad se trata de un patrón normal de respuesta a un estímulo que la produce (Salome, Salchner, Viltart, Sequeira, Wigger, Landgraf *et al.*, 2004). La ansiedad patológica involucra el procesamiento aberrante de la información emocional hipotetizada de tal manera que, refleja las perturbaciones en las vías cerebrales involucradas en el miedo/ansiedad (Singewald, 2007); incluyendo el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal ventromedial y dorsolateral (Åhs, Kragel, Zielinski, Brady *et al.*, 2015). En los seres humanos la ansiedad patológica suele ir acompañada de vigilancia y estado de alerta, hiperactividad de la amígdala y aumento de amplitud de los potenciales evocados auditivos (Nobre, 2013).

Algunos autores diferencian el miedo de la ansiedad en función de su relación temporal, la disfuncionalidad o pérdida de la capacidad para emitir respuestas adaptativas y el daño tisular generado por la activación de largo plazo del sistema simpático-adrenérgico (estrés oxidante, disminución de la neurogénesis, padecimientos cardiovasculares) (Calderón-Guzmán *et al.*, 2014; Leal-Galicia, 2006; Lagraauw, Kuiper & Bot, 2015). Mientras que la ansiedad es la anticipación de una amenaza en el futuro, que puede ser manifiesta o no, el miedo es la respuesta a la amenaza actual frente a un estímulo específico que desencadena la

respuesta, generalmente adaptativa. Sin embargo, el miedo y la ansiedad comparten los mismos síntomas físicos y mentales, entre los que se puede mencionar la taquicardia, taquipnea, hiperhidrosis, hiperglicemia, nerviosismo, inquietud, ideas catastróficas recurrentes, dificultades para concentrarse y el insomnio (Sardinha, Nardi y Zin, 2009).

TRASTORNOS DE ANSIEDAD

El miedo y la ansiedad son respuestas biológicas de adaptación a la amenaza ambiental. Sin embargo, cuando se experimentan durante un largo período, pueden tener un efecto negativo dando lugar a los trastornos de ansiedad (Indovina, Robbins, Núñez-Elizalde, Dunn y Bishop, 2011). La ansiedad puede afectar la capacidad del individuo para llevar a cabo las actividades cotidianas y, en personas con trastorno de ansiedad generalizada, los síntomas pueden durar meses y repetirse con regularidad, además de que a menudo son agravados por los acontecimientos estresantes (Steimer, 2011). Los trastornos de ansiedad ocurren comúnmente junto con otras enfermedades mentales o físicas, incluyendo abuso del consumo de alcohol o sustancias, lo cual puede enmascarar los síntomas de la ansiedad o empeorarlos (Instituto de la Salud Mental, 2008).

El término “trastornos de ansiedad” se usa como término general para una serie de condiciones que incluyen el trastorno de ansiedad por separación, trastorno por mutismo selectivo, trastorno de pánico, fobia específica, agorafobia, la ansiedad social y generalizada, así como la ansiedad inducida por sustancias/medicamentos y, finalmente, la ansiedad atribuible a otras condiciones médicas (*American Psychiatric Association*, 2013).

El **trastorno de ansiedad por separación** se describe como ansiedad excesiva e inapropiada para el nivel de desarrollo del individuo, concerniente a su separación de aquellas personas por las que siente apego, regularmente se acompaña de síntomas físicos cuando se prevé la separación de la figura de apego (*American Psychiatric Association*, 2013).

El **trastorno por mutismo selectivo** se describe como la inhibición persistente del habla en situaciones sociales específicas, presentándose generalmente en los primeros años de vida y muy a menudo dándose de forma evidente una vez que el niño/a alcanza la edad en que empieza a interactuar socialmente fuera del entorno familiar, como durante la primera etapa de escolaridad infantil (Keeton y Budinger, 2012). El niño enfrenta un alto nivel de sufrimiento personal e importantes problemas de adaptación al entorno que pueden influir en su desarrollo personal, social y académico. Frecuentemente, este comportamiento se muestra ante la dificultad para separarse de sus padres, o debido a un comportamiento muy dependiente, extrema timidez, inflexibilidad, problemas de sueño, mal humor, frecuentes berrinches y llanto (Henkin y Bar-Haim, 2015). El miedo persistente a comunicar empieza a manifestarse a través de síntomas, como la falta de expresión en el semblante, quedarse paralizado, falta de reacciones, mantener una postura rígida, escasa sonrisa y, por supuesto, mutismo. Al evitar la utilización del lenguaje oral, el niño/a puede desarrollar otras formas de comunicación alternativa, utilizando gestos o movimientos de cabeza, empujando o apuntando para pedir algo. Si son mayores, suelen comunicarse mediante el lenguaje escrito (Rubin, 2015).

El **trastorno de pánico** se define como una experiencia abrupta de temor intenso o de malestar acentuado, acompañada por síntomas físicos que por lo general comprenden palpitaciones, dolor de pecho, falta de aliento, y en algunos casos, mareos (Durand y Barlow, 2007). A menudo está presente la sensación de peligro o de muerte inminente y una necesidad urgente de escapar. Los síntomas más frecuentes son aturdimiento, nerviosismo, taquicardia y palpitaciones, sudoración, temblores, sensación de ahogo, opresión o malestar torácico, náuseas, mareos, parestesias y escalofríos (Jarne, Talarn, Armayones, Horta y Requena, 2006).

La **fobia específica** es una forma de ansiedad intensa hacia algo que en realidad constituye una amenaza mínima o nula (Choy, Fyer y Lipsitz, 2007). Aunque los adultos con fobias son conscientes de que tales temores son irracionales, con frecuencia encuentran que el enfrentar, o incluso el pensar en tener que enfrentar el objeto o la situación que produce el temor, trae consigo un ataque de pánico o una ansiedad intensa (*American Psychiatric Association*, 2013).

La **ansiedad generalizada** es un trastorno en el que el individuo presenta ansiedad y preocupaciones excesivas (anticipación aprensiva), persistentes, que no están limitadas ni predominan en ninguna circunstancia ambiental en particular (Richards, Richardson, Timulak y McElvaney, 2015). Los síntomas predominantes son muy variables, pero frecuentemente los pacientes refieren sentirse “constantemente nervioso”, con temblores, tensión muscular, sudoración, mareos, palpitaciones, vértigos y molestias epigástricas. Padeecer ansiedad generalizada impacta de manera negativa la vida laboral y familiar de quien la padece (Furtado y Katzman, 2015).

FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA ANSIEDAD

Tanto los datos clínicos como los experimentales apoyan la participación del sistema gabaérgico, y específicamente, de los receptores "A" del ácido γ -amino butírico ($GABA_A$), en las patologías relacionadas a la ansiedad y la depresión (Luscher, Shen y Sahir, 2011). Las benzodiazepinas, como el diazepam, se unen a un sitio específico situado entre las subunidades α y γ del receptor $GABA_A$ y modulan alostéricamente los receptores. Estos receptores participan en procesos tan diversos como el sueño, la ansiedad, el aprendizaje, la memoria, la sintomatología depresiva y la recompensa (Rudolph y Knoflach, 2011). Además se ha sugerido que el receptor puede presentar una diversidad de estados conformacionales, lo cual le permite participar en una gran variedad de procesos patológicos (trastornos de ansiedad, síndrome de abstinencia, epilepsia, esquizofrenia, etc.).

La eficacia bien conocida de las benzodiazepinas y su acción rápida (30-60 minutos), las convierte en un tratamiento terapéutico seguro a corto plazo (Gimeno y Ferre, 2011). Las benzodiazepinas actúan en el sistema nervioso facilitando la neurotransmisión mediada por el complejo de los receptores $GABA_A$. La interacción de GABA con el receptor produce la apertura de canales iónicos permeables al cloruro (Cl^-). El complejo del receptor GABA, es un canal transmembranal constituido por cinco subunidades: dos alfa (α), dos beta (β) y una gama (γ) (Jacob, Moss y Jurd, 2008). Existen múltiples sitios de unión a diferentes ligandos, entre ellos se encuentra el sitio de unión a benzodiazepinas. La interacción de las benzodiazepinas con los receptores a GABA resulta en un aumento del tiempo y la frecuencia de apertura de los canales a Cl^- , es decir, potencian la acción del GABA (Brunton y Chabner, 2012).

Sin embargo, aunque las benzodiazepinas son agentes farmacoterapéuticos seguros, existe gran evidencia del desarrollo de dependencia y tolerancia a sus efectos sedantes, relajantes musculares, anticonvulsivos y ansiolíticos, en el

tratamiento a largo plazo. Se sabe que el síndrome de abstinencia se puede presentar después del cese de su administración. Además de sus efectos negativos sobre la memoria (Carrier y Kabbaj, 2012).

En el tratamiento de los trastornos de ansiedad también se utilizan los antidepresivos (Navarrete y Camarillo, 2013). Los antidepresivos tricíclicos son un grupo de fármacos comúnmente recetados; estos fármacos ejercen un efecto inhibitorio sobre los mecanismos de inactivación de las catecolaminas y la serotonina, favoreciendo la acción de estas. Su eficacia ha sido comprobada en fármacos como la imipramina (Navarrete *et al.*, 2013). Además, también pueden producir bloqueo de los receptores muscarínicos y los histamínicos. Estos efectos neuroquímicos intervienen tanto en las acciones terapéuticas como en las reacciones adversas que incluyen boca seca, hipotensión postural, sedación, taquicardia y disfunción sexual. Por tales efectos secundarios son raramente recetados en el tratamiento de la ansiedad (Vermeiden, Mulder, Van Den Broek, Bruijn y Birkenhäger, 2013).

Por otra parte, existe evidencia que muestra la participación de los receptores 5-TH_{1A} en la ansiedad y la depresión (García-García, Newman-Tancredi y Leonardo, 2014). En 1961, se encontró un mecanismo neuronal para el término de la acción de los neurotransmisores liberados por las terminaciones sinápticas: la recaptura hacia la terminal presináptica mediante la participación de un transportador acoplado a un autoreceptor (Gimeno *et al.*, 2011). En primer lugar este mecanismo se descubrió para la noradrenalina, seguido de otros neurotransmisores como la serotonina. Este descubrimiento permitió el desarrollo de nuevos fármacos, los llamados inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), como la fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, paroxetina, etc. (Oliver, 2014).

Los inhibidores de la recaptura de serotonina (ISRS) son antidepresivos atípicos que inhiben la recaptación de serotonina. Este grupo de fármacos es considerado por todas las guías internacionales como una opción de primera línea (Koen *et al.*, 2011). Recientes investigaciones encontraron que pacientes tratados con sertralina y paroxetina (ambos ISRS) muestran un aumento del volumen hipocampal después del tratamiento (Bossini, Tavanti, Lombardelli, Calossi, Polizzotto, Galli *et al.*, 2007). Los ISRS resultan ser efectivos en el tratamiento de la ansiedad y la depresión, con reducción de los síntomas por lo general logrados después de 3-6 semanas (Quidé, Witteveen, El-Hage, Veltman y Olf, 2012). Aunque se toleran bien algunos pacientes presentan excitabilidad, insomnio o cefalea, durante los primeros días de tratamiento, que se pueden controlar disminuyendo la dosis. Más a largo plazo, los efectos adversos incluyen mareos, aumento de peso y disfunción sexual. El efecto ansiolítico suele presentarse a partir de la segunda o cuarta semana y para evitar la hiperestimulación e insomnio, se debe tomar por las mañanas. Salvo que se padezca de somnolencia diurna (Gimeno *et al.*, 2011)

Las acciones de la serotonina están mediadas fundamentalmente por receptores acoplados a proteínas G, y finalizan por recaptación, vía proteínas transportadoras de serotonina, en la terminal axonal y células gliales. Así pues, los ISRS actúan prolongando las acciones de la serotonina en sus receptores al inhibir la recaptación (Bear, Barry y Paradiso, 2008). El uso de esos fármacos es común en la investigación con animales (Pickles, Hagan, Jones y Hendrie, 2012; Carrier *et al.*, 2012; Raz y Berger, 2010).

Actualmente se sabe que el factor de transcripción celular (CREB) regula las respuestas de adaptación, tales como la consolidación de la memoria, la adicción (circuito de la recompensa) y el refinamiento sináptico (Kida y Serita, 2014). Recientemente se demostró que el estrés psicosocial como modelo animal de depresión estimula la transcripción de CREB en el cerebro, y que ésta es

bloqueada por el tratamiento con imipramina (Nestler, Barot, DiLeone, Eisch, Gold y Monteggia, 2002); así como con la administración de fluoxetina (Böer, Noll, Cierny, Krause, Hiemke y Knepel, 2009). Se llegó a esta conclusión después de que a un grupo de ratones transgénicos con genes reporteros de CREB (utilizando luciferasa), para obtener la información de la transcripción de CREB *in vivo*, fueron expuestos al modelo de estrés psicosocial durante 25 días. Se encontró que la sola exposición al modelo estimula la expresión de CREB en el hipocampo y otras regiones cerebrales. Después de 21 días de tratamiento farmacológico el aumento en la transcripción de CREB es abolido (Nestler *et al.*, 2009). Sin embargo los resultados de este estudio enfatizan el papel de expresión génica de CREB inducida por el estrés y además, sugieren que la inhibición de la actividad de CREB puede ser un mecanismo de acción común de los ISRS subyacente a su efecto antidepresivo (Böer *et al.*, 2009).

MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA ANSIEDAD

DEFINICIÓN

En la investigación biomédica, un modelo se describe generalmente como un montaje experimental o protocolo (a veces también llamado "un paradigma") desarrollado con el objetivo de replicar características fisiológicas, fisiopatológicas, o conductuales humanas específicas de un padecimiento (Steimer, 2011).

Los modelos animales de psicopatología se han convertido en una herramienta muy valiosa en el análisis de las diversas causas genéticas, ambientales o farmacológicas que pueden provocar síntomas en los pacientes con un trastorno específico (Shekhar, McCann y Meaney, 2001). Además, los modelos animales son especialmente útiles en situaciones en las que el impacto del estrés no puede estudiarse en seres humanos debido a razones éticas (Kumar *et al.*, 2013). Por lo tanto los modelos animales son esenciales para la comprensión de la fisiopatología de las alteraciones conductuales inducidas por el estrés y para el desarrollo de terapias efectivas para su tratamiento óptimo (Jaggi *et al.*, 2011). Especialmente, los modelos en roedores han demostrado ser de gran valor en la identificación de los mecanismos fisiopatológicos y los objetivos terapéuticos para los trastornos emocionales (Cryan y Holmes, 2005)

Aunque también es necesario mencionar que los datos derivados de los modelos animales son de valor sólo en medida en que dichos modelos son válidos, y que el nivel de la enfermedad provocada en animales puede no ser el nivel del padecimiento humano (Phatak, Kasture, Bhatt y Patel, 2011). Aún con ello, los modelos animales pueden ser útiles para saber más sobre las bases biológicas de los trastornos de ansiedad y para desarrollar nuevos y más eficientes tratamientos farmacológicos y conductuales (Steimer, 2011).

MODELO DE ENTERRAMIENTO DEFENSIVO

Este modelo ha sido ampliamente utilizado, en el estudio de las respuestas emocionales en roedores (Borin, Petit-Demoulière, Dhonnchadha y Hascöet, 2007). El comportamiento consiste en una serie de movimientos estereotipados de las patas delanteras y todo el cuerpo orientado a cubrir el electrodo con aserrín de la parte inferior de la jaula a través del cual el animal recibe una descarga eléctrica de 0.3 mA cada vez que toca el electrodo (Treit, Pinel y Fibiger, 1981; Saldívar-González, Rojas, Ramírez-Miranda, Ortiz-León, Foilloux-Morales, Álvarez-Sekely *et al.*, 2008).

Los parámetros conductuales registrados son:

1) Latencia de enterramiento, es decir, el tiempo transcurrido entre los choques y el inicio de la conducta de enterramiento (CE) defensivo. Este parámetro se ha relacionado con la capacidad de los animales para identificar el electrodo como la fuente del estímulo aversivo (Treit *et al.*, 1981; Saldívar-González *et al.*, 2007).

2) El tiempo de enterramiento que las ratas mostraron la conducta de enterramiento defensivo. La expresión del comportamiento de enterramiento defensivo refleja el nivel emocional de la rata de una manera directa, es decir, un bajo tiempo de enterramiento defensivo es igual a una baja ansiedad experimental. Por el contrario, un tiempo alto de enterramiento indica aumento de la ansiedad experimental (Treit *et al.*, 1981; Saldívar-González, Posadas-Andrews, Rojas, Yoldi-Negrete, Álvarez-Sekely, Flores-Hernández *et al.*, 2007).

3) El número de choques recibidos. Este número puede indicar cambios nociocéptivos inducidos por el tratamiento farmacológico (Treit *et al.*, 1981; Saldívar-González *et al.*, 2007).

MODELO DE ESTRÉS CRÓNICO (HACINAMIENTO)

El alojamiento de los animales bajo determinadas condiciones ambientales puede alterar la conducta y el estado fisiológico y bioquímico; se ha observado que el hacinamiento de ratas produce un aumento de corticosterona en plasma (Slezak, Puzserova, Balis, Sestakova, Majzunova, Dovinova *et al.*, 2014). Muchas de las alteraciones observadas durante un alojamiento en grupo de varios animales en espacios pequeños, han demostrado la eficacia de este modelo para el estrés psicosocial (Dronjak, Gavrilovic', Filipovic' y Radojc'ic, 2004). Investigaciones previas han llegado a la conclusión de que el hacinamiento puede ser un factor de estrés significativo ya que es capaz de alterar simultáneamente el comportamiento, la frecuencia cardiaca y las concentraciones de corticosterona en los animales (Nephew, Aaron y Romero, 2005).

MODELO DE ESTRÉS AGUDO (*FOOT SHOCK*)

La aplicación de un choque eléctrico de intensidad leve en las patas de los roedores se ha utilizado como un factor desencadenante de la respuesta al estrés (Jaggi *et al.*, 2011). La aplicación un choque eléctrico en las patas de ratas produce un aumento de triptófano, el precursor de la serotonina (Pawlak, Takada, Urano y Takada, 2000). Recientemente se ha observado que la administración del agonista (8-HO-DPAT) para el receptor de serotonina (5HT_{1A}), estimula un aumento significativo en la expresión del ARN_m que codifica para el factor liberador de corticotropina en la región hipotalámica, además aumenta la liberación de la hormona adrenocorticotrópica en la hipófisis (Medeiros, Cartolano y McDonald, 2014). Se ha demostrado que el *foot shock* puede ser utilizado como modelo de estrés (Haj-Mirzaian, Ostadhadi, Kordjazy, Dehpour y Mehr, 2014).

JUSTIFICACIÓN

Se estima que los trastornos de ansiedad y del estado de ánimo son los trastornos mentales más prevalentes en el mundo (Kessler, Berglund, Demler, Ji, Merikangas y Walters, 2005). Los trastornos del estado de ánimo son la causa más frecuente de morbilidad y discapacidad en todo el mundo (Lebron-Milan y Milad, 2012).

Aunque el DSM-V describe subtipos de trastornos de ansiedad y trastornos del estado de ánimo, la ansiedad y los trastornos del estado de ánimo comparten síntomas; entre los que se encuentran, alteraciones del peso y apetito, irritabilidad, dificultades para concentrarse, palpitaciones, opresión o malestar torácico, inquietud o impaciencia, fatiga, tensión muscular y alteraciones del sueño. Por tal motivo comparten, también, tratamientos muy similares (Van Tol, Van Der Wee, Van den Heuvel, Nielen, Demenescu, Aleman *et al.*, 2010). Específicamente, los trastornos de ansiedad y del estado de ánimo se han asociado con cambios morfológicos y funcionales, como reducción en el número de sinapsis, eliminación de células gliales en la corteza prefrontal medial y disminución de la actividad neural en la corteza prefrontal ventromedial (Chocyk, Majcher-Maślanka, Dudys, Pryborowska y Wędzony, 2013).

En los últimos 15 años el desarrollo de un grupo de técnicas moleculares para ser utilizados de la investigación biológica y la creciente necesidad de comprender los trastornos relacionados con la ansiedad, han llevado a un aumento de estudios que combinan herramientas moleculares con pruebas conductuales de ansiedad (Ramos, 2008). Sin embargo, esta revolución técnica no prosperará plenamente si no va acompañada de un aumento paralelo relacionado con nuestra capacidad para interpretar los datos obtenidos y sus implicaciones conductuales en modelos animales (Cryan *et al.*, 2005). Del mismo modo, un entrenamiento serio en el uso

de herramientas de medición de la conducta debe ser visto como un requisito para aquellos que deseen incursionar en el campo del análisis conductual (Ramos, 2008).

HIPÓTESIS

- 1) El hacinamiento en la rata (estrés crónico) produce aumento de la CE.
- 2) La aplicación de un choque eléctrico (estrés agudo) produce un aumento en la CE.
- 3) La combinación de hacinamiento (estrés crónico) y choque eléctrico (estrés agudo) produce aumento en la CE.
- 4) La administración de ansiolíticos disminuye la CE en ratas sometidas a estrés crónico y agudo simultáneamente.
- 5) La administración de antidepresivos disminuye la CE en ratas sometidas a estrés crónico y agudo simultáneamente.

OBJETIVOS GENERALES:

- 1) Determinar si la administración de antidepresivos es capaz de disminuir la CE en ratas sometidas a estrés crónico y agudo.
- 2) Determinar si la administración de ansiolíticos es capaz de disminuir la CE en ratas sometidas a estrés crónico y agudo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Determinar si la administración de Clorhidrato de imipramina a dosis de 10, 20 y 30 mg/kg por vía oral (VO) durante 10 días es capaz de reducir la CE de una forma dosis dependiente.
- 2) Determinar si la administración Clorhidrato de fluoxetina a dosis de 10, 20 y 30 mg/kg por vía oral (VO) durante 10 días es capaz de reducir la CE de una forma dosis dependiente.
- 3) Determinar si la administración de diazepam a dosis de 1,3 y 5 mg/kg por vía oral (VO) durante 5 días es capaz de reducir la CE de una forma dosis dependiente.

MATERIAL Y MÉTODO

Sujetos

En el presente estudio se usaron 181 ratas macho de la cepa Wistar de 250-300 gr de peso obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. A lo largo de los experimentos los sujetos se encontraron en el bioterio del departamento de farmacología, en un cuarto con el ciclo de luz oscuridad invertido de 12:12 (0800:2000) y dispusieron de alimento y agua a libre demanda. Esta investigación se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos del comité local de ética y con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Materiales

Se utilizaron 3 fármacos:

1. Diazepam: sustancia pura de Laboratorios Roche.
2. Clorhidrato de fluoxetina: sustancia pura de laboratorios Eli-Lilly y Cía. de México.
3. Clorhidrato de imipramina: sustancia pura de laboratorios Ciba-Geigy

Las sustancias usadas fueron gentilmente donadas por Roche, Eli-Lily y Ciba-Geigy. Los fármacos se administraron por VO diluidos en agua.

Procedimiento

Los animales usados en el presente trabajo procedían del bioterio central de la facultad de medicina posteriormente se trasladaban al bioterio del departamento de farmacología. Una vez en el bioterio, los animales permanecían 5 días con el propósito de habituarse al ciclo luz/oscuridad antes de ser sometidos a cualquier

manipulación experimental. La luz se encendía a las 20:00 y se apagaba a las 8:00. Las observaciones conductuales se llevaron a cabo dos horas después del inicio de la fase de luz, en un cuarto oscuro iluminado con luz roja tenue.

Los experimentos se realizaron con el objetivo de analizar la conducta de enterramiento. Los parámetros estudiados fueron: la conducta de enterramiento expresada en segundos \pm EE, latencia de enterramiento en segundos \pm EE, la altura del recubrimiento en centímetros \pm EE y el número de choques que recibió cada animal \pm EE.

Los fármacos se administraron por VO. La dosis administrada se diluía en agua que el animal extraía del bebedero que era cambiado cada 24 horas.

Modelo de enterramiento defensivo

Con el propósito de determinar los niveles de ansiedad de las ratas, en este trabajo, se usó el modelo de enterramiento defensivo condicionado de Treit (Treit, *et al*, 1981; Treit, 1985). Durante la prueba de comportamiento de enterramiento, el animal se colocó durante 10 minutos en una caja de acrílico de 27 x 16 x 23 cm. La rata recibió una descarga eléctrica de 0.3 mA de un estimulador a través del electrodo bipolar, de 7 cm de longitud, fijado a la pared frontal de la jaula. Una vez que el electrodo es identificado como la fuente del estímulo aversivo, los animales muestran el comportamiento defensivo (Treit, 1985).

Durante la realización de la prueba de enterramiento se registraron 4 parámetros: número de choques, latencia, enterramiento y altura. A continuación se explica cada uno.

Número de choques: es el número de choques eléctricos, provenientes del electrodo, que recibe el animal antes de que empiece a mostrar la conducta de enterramiento. Una vez que muestra esta conducta, el electrodo deja de conducir la corriente.

Latencia: es el tiempo que transcurre desde que el animal es introducido en la caja para realizar la prueba, hasta que inicia la conducta de enterramiento.

Enterramiento: es el tiempo que el animal pasa mostrando la conducta de enterramiento.

Altura: es la altura en cm que alcanza la acumulación de aserrín producida por la conducta de enterramiento que realiza el animal para cubrir el electrodo.



Imagen 2. Esta imagen muestra las condiciones en las que se lleva a cabo el modelo de enterramiento defensivo.

Modelo de estrés crónico (hacinamiento)

Para la condición de estrés crónico se expuso a los animales al modelo de hacinamiento. Tres animales permanecieron en una caja de acrílico de 27 x 16 x 23 cm, donde habitualmente se mantiene a una sola rata, permanecieron en esta condición durante diez días. Los animales se mantuvieron en un régimen de agua y comida a libre demanda.



Imagen 3. Esta imagen muestra la condición de hacinamiento (estrés crónico).

Modelo de estrés agudo (*foot shock*)

Para la condición de estrés agudo los animales permanecieron, de manera individual, en cajas de acrílico de 27 x 16 x 23 cm, permanecieron en esta condición durante 48 horas previas a la observación conductual. Durante todo el tiempo los animales se mantuvieron en un régimen de agua y comida a libre demanda. Noventa segundos antes de ser probados en el modelo de Treit, los animales eran colocados entre dos placas de metal en las que recibían un choque eléctrico de 0.7 mA.



Imagen 4. En esta imagen se observa la condición de choque eléctrico (estrés agudo).

Para la realización del presente estudio se utilizaron diferentes grupos. Las manipulaciones a las que se expuso cada grupo, el número (n) de sujetos por grupo y la temporalidad de dichas manipulaciones se exponen en la siguiente tabla (tabla 1):

Condición	Hacinamiento	Choque	Fármaco	Modelo de Enterramiento Defensivo
Grupo				
Control				Permanecieron en cajas individuales 48 hrs. antes de la prueba
Hacinamiento	Permanecieron en grupos de 3 animales durante 10 días			Al décimo día fueron probados en el modelo.
Choque		Recibieron un choque eléctrico de 0.7 mA 90 segundos antes de la prueba.		Permanecieron en cajas individuales 48 hrs. antes de la prueba
Hacinamiento+Choque	Permanecieron en grupos de 3 animales durante 10 días	Recibieron un choque eléctrico de 0.7 mA 90 segundos antes de la prueba.		Al décimo día fueron probados en el modelo.
Hacinamiento+Choque+ Diazepam (3)	Permanecieron en grupos de 3 animales durante 10 días	Recibieron un choque eléctrico de 0.7 mA 90 segundos antes de la prueba.	5 días antes de ser probados en el modelo se les administró VO 1, 3 o 5 mg/kg de Dz.	Al décimo día fueron probados en el modelo.
Control de Diazepam (3)			5 días antes de ser probados en el modelo se les administró VO 1, 3 o 5 mg/kg de Dz.	Al quinto día fueron probados en el modelo.
Hacinamiento+Diazepam	Permanecieron en grupos de 3 animales durante 10 días		5 días antes de ser probados en el modelo se les administró VO 1 mg/kg de Dz.	Al décimo día fueron probados en el modelo.
Choque+Diazepam		Recibieron un choque eléctrico de 0.7 mA 90 segundos antes de la prueba.	5 días antes de ser probados en el modelo se les administró VO 1 mg/kg de Dz.	Al quinto día fueron probados en el modelo.
Hacinamiento+Choque+ Fluoxetina (3)	Permanecieron en grupos de 3 animales durante 10 días	Recibieron un choque eléctrico de 0.7 mA 90 segundos antes de la prueba.	10 días antes de ser probados en el modelo se les administró VO 10, 20 o 30 mg/kg de Fl.	Al décimo día fueron probados en el modelo.
Control de Fluoxetina (3)			10 días antes de ser probados en el modelo se les administró VO 10, 20 o 30 mg/kg de Fl.	Al décimo día fueron probados en el modelo.
Hacinamiento+Fluoxetina	Permanecieron en grupos de 3 animales durante 10 días		10 días antes de ser probados en el modelo se les administró VO 20 mg/kg de Fl.	Al décimo día fueron probados en el modelo.
Choque+Fluoxetina		Recibieron un choque eléctrico de 0.7 mA 90 segundos antes de la prueba.	10 días antes de ser probados en el modelo se les administró VO 20 mg/kg de Fl.	Al décimo día fueron probados en el modelo.
Hacinamiento+Choque+ Imipramina (3)	Permanecieron en grupos de 3 animales durante 10 días	Recibieron un choque eléctrico de 0.7 mA 90 segundos antes de la prueba.	10 días antes de ser probados en el modelo se les administró VO 10, 20 o 30 mg/kg de imipramina.	Al décimo día fueron probados en el modelo.

Tabla 1. Diseño experimental. Se señala la distribución de grupos y las diferentes manipulaciones experimentales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el presente trabajo los resultados fueron analizados con un análisis de varianza (ANDEVA) por lo que se utilizó la prueba de Kruskall Wallis. Posteriormente se aplicó la U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos.

RESULTADOS

Efecto de la exposición a dos eventos estresantes (hacinamiento y choque eléctrico)

En la figura número 1 se puede observar el efecto del hacinamiento, el choque eléctrico y la combinación de ambas manipulaciones, sobre la CE (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 15.410$, $p \leq 0.001$). Las barras representan el grupo control, el grupo de diez días de hacinamiento, el grupo sometido a choque eléctrico 0.7 mA y finalmente el grupo en el que se combinan ambos eventos.

El grupo de sujetos sometido a 10 días de hacinamiento muestra un incremento del 69.5% de la CE, comparado contra la respuesta del grupo control (Fig. 1). Así mismo, se observa un incremento en la respuesta del grupo de animales sometidos al choque eléctrico de 93% *versus* el grupo control (Fig. 1). Por otra parte, el grupo de animales sometido a hacinamiento y choque eléctrico muestra una disminución en la CE de 53.5, 73 y 76% cuando se compara contra el grupo control, grupo de hacinamiento y grupo de choque eléctrico respectivamente (Fig. 1). El análisis del número de choques (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 1.051$, $p \leq 0.788$), la latencia para iniciar la CE (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 5.189$, $p \leq 0.158$) y la altura del material de recubrimiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 8.129$, $p \leq 0.043$) se muestran en la tabla 2. Aunque el número de choques que reciben los animales del grupo de choque eléctrico es bajo comparado con los otros grupos, no existe diferencia estadísticamente significativa. La altura del material de recubrimiento es diferente cuando se compara al grupo de hacinamiento diez días y al grupo expuesto a ambas condiciones ($p \leq 0.001$), lo mismo ocurre al comparar a este último con el grupo que sólo recibe el choque eléctrico ($p \leq 0.032$) (Tabla 2).

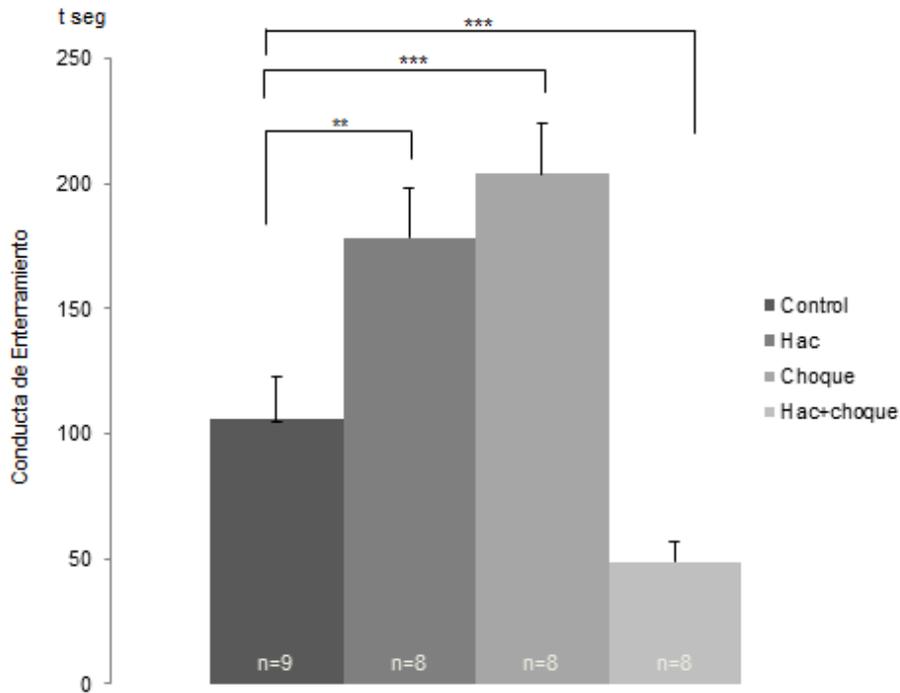


Figura 1. En esta figura se presenta el efecto del hacinamiento, el choque eléctrico y la combinación de ambos, sobre la conducta de enterramiento, expresada en segundos (media \pm EE). Las barras representan el grupo control (n=9), el grupo de diez días de hacinamiento (Hac, n=8), el grupo sometido a choque eléctrico 0.7 mA (Choque, n=8) y finalmente el grupo en el que se combinan ambos eventos (Hac + choque, n=9). Prueba U de Mann Whitney, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

	Número de choques	Latencia	Altura
Control	3.44 \pm 0.68	45.77 \pm 7.88	3.55 \pm 1.02
Hacinamiento	5.00 \pm 1.16	128.00 \pm 42.52	2.25 \pm 1.33**
Choque	2.71 \pm 0.84	24.28 \pm 6.34	4.57 \pm 1.23**
Hacinamiento+choque	3.11 \pm 0.73	61.22 \pm 28.21	2.05 \pm 0.65*

Tabla 2. Efecto del Hacinamiento de diez días, del choque eléctrico 0.7 mA y la combinación de ambas manipulaciones.

Efecto de la administración de diazepam en animales sometidos a hacinamiento, choque eléctrico y a la exposición a ambas condiciones

En la figura 2 se presenta el efecto de la administración de diazepam VO, durante cinco días consecutivos (1, 3 y 5 mg/kg), sobre la CE en animales sometidos a dos condiciones de estrés (hacinamiento y choque eléctrico) (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 21.470$, $p \leq 0.0003$). Las barras representan el grupo control, el grupo sometido a diez días de hacinamiento y un choque eléctrico, y los grupos tratados con diazepam (1, 3 y 5 mg/kg; Fig. 2). El análisis de la número de choques (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 0.879$, $p \leq 0.928$), la latencia para iniciar la CE (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 2.495$, $p \leq 0.645$) y la altura del material de recubrimiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 9.561$, $p \leq 0.048$) se muestran en la tabla 3. En la altura del material de recubrimiento, el grupo que fue expuesto a ambas manipulaciones, hacinamiento diez días y choque eléctrico de 0.7 mA, es diferente a los grupos que estuvieron en las mismas condiciones y que recibieron 1 y 5 mg/kg de Dz, respectivamente ($p \leq 0.007$ y $p \leq 0.005$) (Tabla 3).

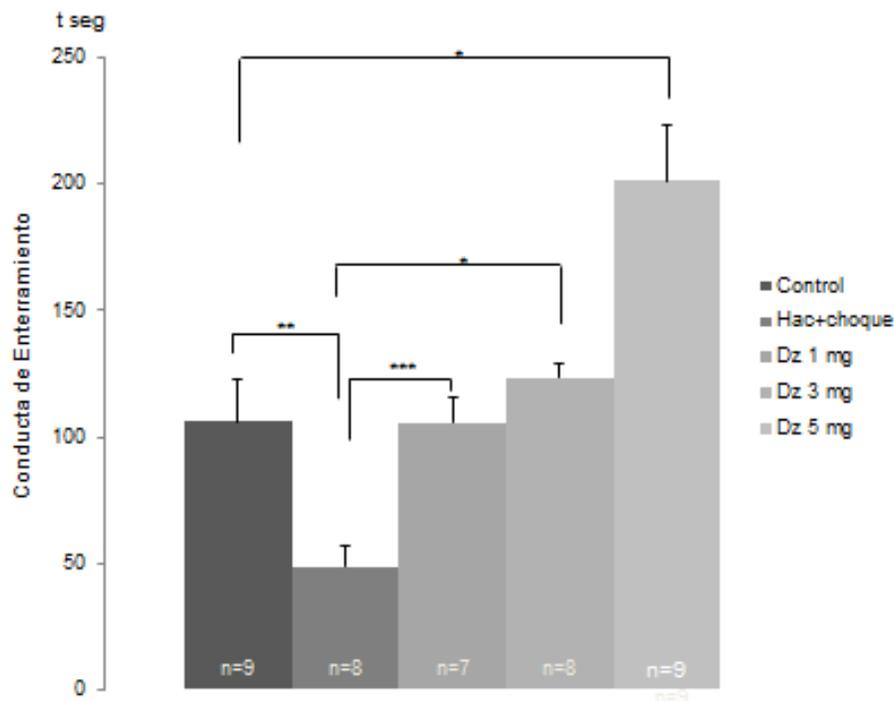


Figura 2. En la figura se observa el efecto de la administración crónica de diazepam, sobre la conducta de enterramiento expresada en segundos (media \pm EE), en animales sometidos a dos condiciones de estrés (choque eléctrico y hacinamiento). El fármaco se administró vía oral durante cinco días consecutivos a 1, 3 y 5 mg/kg de peso. Las barras representan el grupo control (n=9), el grupo sometido a 10 días de hacinamiento y un choque eléctrico de 0.7 mA (Hac + choque, n=8). Las tres barras a la derecha representan los grupos de hacinamiento más choque eléctrico tratados farmacológicamente, 1 mg (Dz 1 mg, n=7), 3 mg (Dz 3 mg, n=8) y 5 mg de diazepam (Dz 5 mg, n=9). Prueba U de Mann Whitney para análisis pareado; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

	Número de choques	Latencia	Altura
Control	3.44 \pm 0.68	45.77 \pm 7.88	3.55 \pm 1.02
Hacinamiento+choque	3.11 \pm 0.73	61.22 \pm 28.21	2.05 \pm 0.65*
Diazepam 1 mg	3.57 \pm 0.64	39.28 \pm 10.18	3.35 \pm 0.58*
Diazepam 3 mg	3.37 \pm 0.72	52.25 \pm 15.05	4.31 \pm 1.02
Diazepam 5 mg	3.33 \pm 0.58	31.66 \pm 7.13	5.66 \pm 0.72*

Tabla 3. Efecto de la administración de 1, 3 y 5 mg/kg de diazepam VO durante 5 días consecutivos en al grupo de animales de la doble manipulación (hacinamiento + choque eléctrico de 0.7 mA).

En la figura 3 se puede observar el efecto de la administración crónica de diazepam VO, durante cinco días consecutivos, sobre la CE en animales que no fueron sometidos a ningún tipo de manipulación experimental (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 13.235$, $p \leq 0.004$). Las barras representan el grupo control y los grupos de 1, 3 y 5 mg de diazepam (Fig. 3).

En esta figura se puede observar que los tres grupos de animales que recibieron las diferentes dosis de diazepam y que no fueron sometidos a ningún tipo de manipulación muestran una disminución de la CE comparado con el grupo que no recibió el fármaco. La disminución de la conducta mostrada es dosis dependiente; la magnitud de la reducción inducida por la administración de diazepam fue de 34%, 45% y 74% para los grupos de 1, 3 y 5 mg/kg de diazepam respectivamente, comparado con el grupo control (Fig. 3). El análisis del número de choques (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 0.407$, $p \leq 0.938$), la latencia para iniciar la CE (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 1.047$, $p \leq 0.789$) y la altura del material de recubrimiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 3.837$, $p \leq 0.279$) se muestran en la tabla 4.

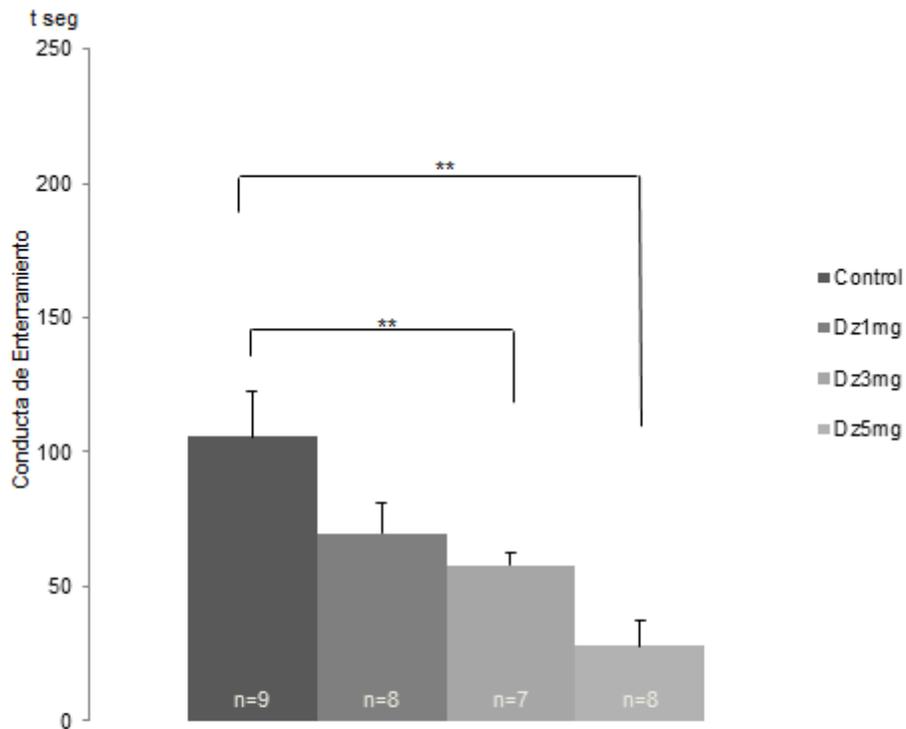


Figura 3. La figura presenta el efecto de la administración crónica de diazepam, vía oral durante cinco días consecutivos, sobre la conducta de enterramiento expresada en segundos (media \pm EE). En el presente experimento, los sujetos no fueron sometidos a ningún tipo de manipulación. Las barras representan el grupo control (n=9), 1 mg (Dz 1 mg, n=8), 3 mg (Dz 3 mg, n=7) y 5 mg de diazepam (Dz 5 mg, n=8). Prueba U de Mann Whitney para análisis pareado; ** $p \leq 0.01$.

	Número de choques	Latencia	Altura
Control	3.44 \pm 0.68	45.77 \pm 7.88	3.55 \pm 1.02
Diazepam 1 mg	4.00 \pm 0.93	33.60 \pm 7.90	3.10 \pm 1.12
Diazepam 3 mg	4.4 \pm 0.98	37.71 \pm 7.05	2.71 \pm 0.90
Diazepam 5 mg	3.33 \pm 0.78	47.50 \pm 14.37	0.50 \pm 0.37

Tabla 4. Efecto de la administración de diazepam a 1, 3 y 5 mg/kg VO durante 5 días consecutivos, a animales sin ninguna manipulación.

La figura 4 muestra el efecto de la administración de diazepam, vía oral durante cinco días consecutivos, sobre la CE en animales sometidos a diez días de hacinamiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 8.337$, $p \leq 0.0152$). Las barras representan el grupo control, el grupo sometido a diez días de hacinamiento y el grupo de 1 mg de diazepam. El análisis del número de choques (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 1.480$, $p \leq 0.477$), la latencia para iniciar la CE (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 14.540$, $p \leq 0.0007$) y la altura del material de recubrimiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 9.678$ $p \leq 0.007$) se muestran en la tabla 5. U de Mann-Whitney muestra diferencia entre el grupo de Hacinamiento y el grupo tratado con diazepam ($p \leq 0.032$) en la latencia presentada. También, existe diferencia entre grupos cuando se compara la altura del material de recubrimiento: el grupo expuesto a diez días de Hacinamiento Vs el grupo que fue expuesto a la misma condición y que recibió el fármaco (U de Mann-Whitney, $p \leq 0.001$) y al comparar al grupo control con el grupo expuesto a diez días de hacinamiento + administración de fármaco (U de Mann-Whitney, $p \leq 0.036$).

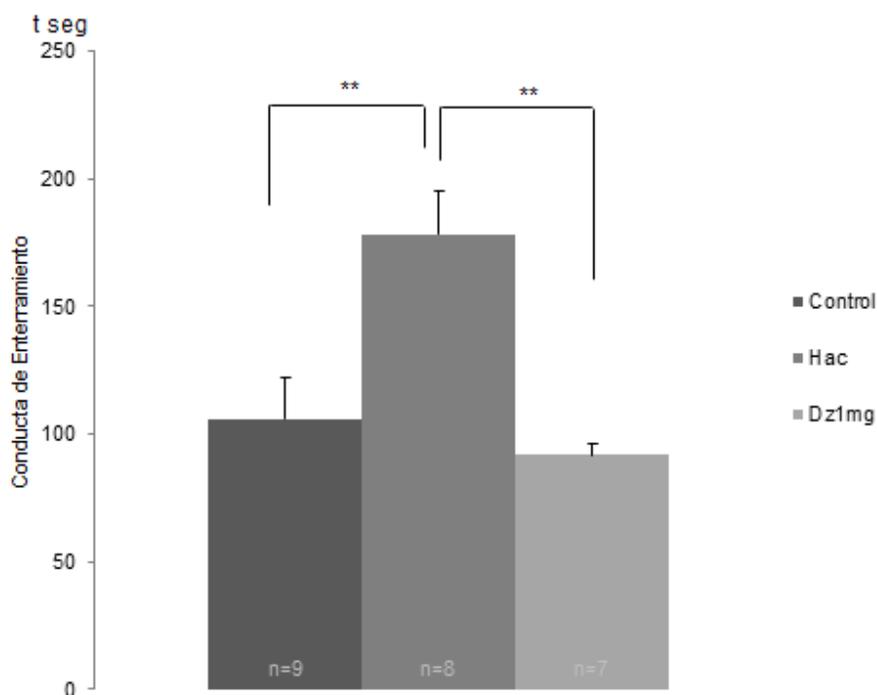


Figura 4. La figura muestra el efecto de la administración de diazepam, sobre la conducta de enterramiento expresada en segundos (media \pm EE), en animales sometidos a diez días de hacinamiento. El fármaco se administró vía oral durante 5 días consecutivos a 1mg/kg de peso. Las barras representan el grupo control (n=9), el grupo sometido a 10 días de hacinamiento (Hac, n=8) y el grupo de 1 mg de Diazepam (Dz 1 mg). Prueba U de Mann Whitney para análisis pareado; ** $p \leq 0.01$.

	Número de choques	Latencia	Altura
Control	3.44 \pm 0.68	45.77 \pm 7.88	3.55 \pm 1.02*
Hacinamiento	5.00 \pm 1.16	128.00 \pm 42.52***	2.25 \pm 1.33***
Diazepam 1 mg	2.42 \pm 0.29	70.42 \pm 9.66***	1.00 \pm 0.43**** *

Tabla 5. Efecto de la administración de 1 mg/kg de diazepam VO durante 5 días consecutivos, a animales expuestos a diez días de hacinamiento.

En la figura 5 se presenta el efecto de la administración crónica de diazepam, VO durante cinco días consecutivos, sobre la CE en animales sometidos a un choque eléctrico (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 12.120$, $p \leq 0.002$). Las barras representan el grupo control, el grupo sometido a choque eléctrico 0.7 mA y el grupo de 1 mg de Diazepam (Fig. 5).

Los animales que recibieron el choque eléctrico y al que se le administró el diazepam VO muestran una disminución del 59% en la CE comparado con el grupo que estuvo en las mismas condiciones pero que no recibió el fármaco (Fig. 5). Además, se puede observar una clara semejanza en los niveles de CE del grupo que recibió el fármaco y el grupo control (Fig. 5). El análisis del número de choques (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 2.859$, $p \leq 0.239$), la latencia para iniciar la CE (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 3.718$, $p \leq 0.155$) y la altura del material de recubrimiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 4.004$, $p \leq 0.135$) se muestran en la tabla 6.

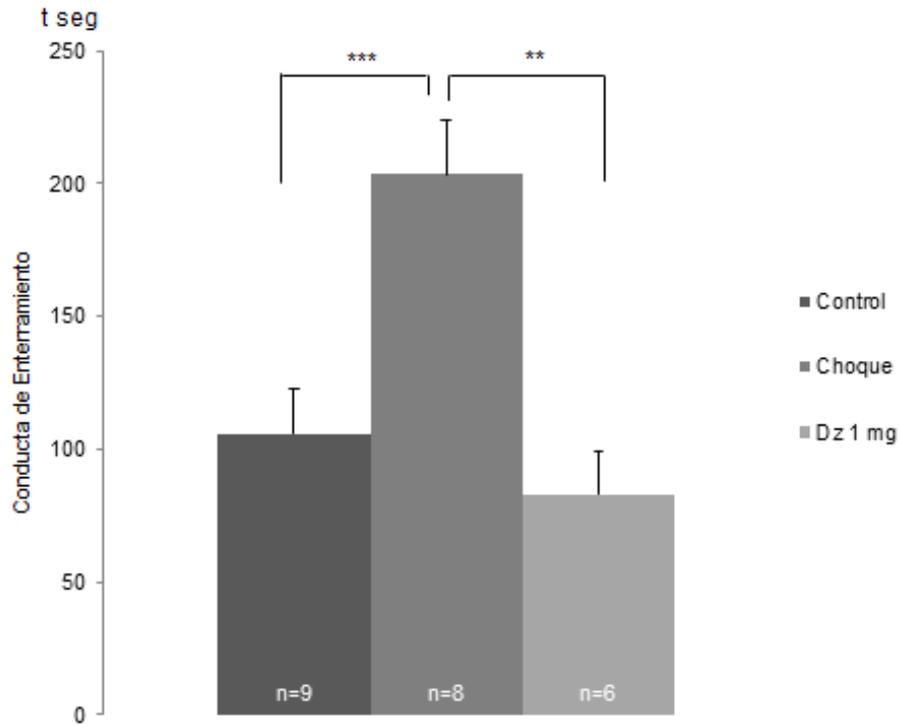


Figura 5. La figura presenta el efecto de la administración crónica de diazepam, sobre la conducta de enterramiento expresada en segundos (media \pm EE), en animales sometidos a un choque eléctrico. El fármaco se administró vía oral durante cinco días consecutivos a 1mg/kg de peso. Las barras representan el grupo control (n=9), el grupo sometido a choque eléctrico 0.7 mA (Choque, n=8) y el grupo de 1 mg de Diazepam (Dz 1 mg). Prueba U de Mann Whitney para análisis pareado; *** $p \leq 0.001$.

	Número de choques	Latencia	Altura
Control	3.44 \pm 0.68	45.77 \pm 7.88	3.55 \pm 1.02
Choque	2.71 \pm 0.84	24.28 \pm 6.34	4.57 \pm 1.23
Diazepam 1 mg	4.33 \pm 0.61	66.16 \pm 11.89	1.33 \pm 0.67

Tabla 6. Efecto de la administración de 1 mg/kg de diazepam VO durante 5 días consecutivos, a animales expuestos a un choque eléctrico de 0.7 mA.

Efecto de la administración de clorhidrato de fluoxetina en animales sometidos a hacinamiento, choque eléctrico y a la exposición a ambas condiciones

La figura 6 muestra el efecto de la administración crónica de clorhidrato de fluoxetina, durante diez días consecutivos (10, 20 y 30 mg/kg), sobre la CE en animales sometidos a diez días de hacinamiento y un choque eléctrico. Las barras representan el grupo control, el grupo sometido a diez días de hacinamiento y un choque eléctrico, y los grupos tratados (10, 20 y 30 mg/kg de clorhidrato de fluoxetina) (Fig. 6).

La figura 6 muestra un aumento de la CE, estadísticamente significativo (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 10.209$, $p \leq 0.037$), el análisis pareado muestra que los grupos de 20 y 30 mg de clorhidrato de fluoxetina son diferentes, estadísticamente hablando, comparados con sus controles (Fig. 6). El aumento observado en la CE defensiva, en los grupos de animales que recibieron el clorhidrato de fluoxetina es dosis dependiente. El grupo de 20 mg muestra un aumento del 54% y el de 30 mg, 87% comparado con el grupo de animales sometidos a diez días de hacinamiento y un choque eléctrico que no recibieron tratamiento (Fig. 6). El análisis del número de choques (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 7.260$, $p \leq 0.122$), la latencia para iniciar la CE (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 5.607$, $p \leq 0.230$) y la altura del material de recubrimiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 3.180$, $p \leq 0.528$) se muestran en la tabla 7.

	Número de choques	Latencia	Altura
Control	3.44 ± 0.68	45.77 ± 7.88	3.55 ± 1.02
Hacinamiento+choque	3.11 ± 0.73	61.22 ± 28.21	2.05 ± 0.65
Fluoxetina 10 mg	4.50 ± 0.85	47.37 ± 9.81	3.12 ± 0.71
Fluoxetina 20 mg	3.88 ± 0.51	28.88 ± 6.93	3.22 ± 0.63
Fluoxetina 30 mg	5.37 ± 1.00	48.87 ± 8.70	2.87 ± 1.15

Tabla 7. Efecto de la administración de 10, 20 y 30 mg/kg de fluoxetina VO durante 10 días consecutivos en al grupo de animales de doble manipulación (hacinamiento + choque eléctrico de 0.7 mA).

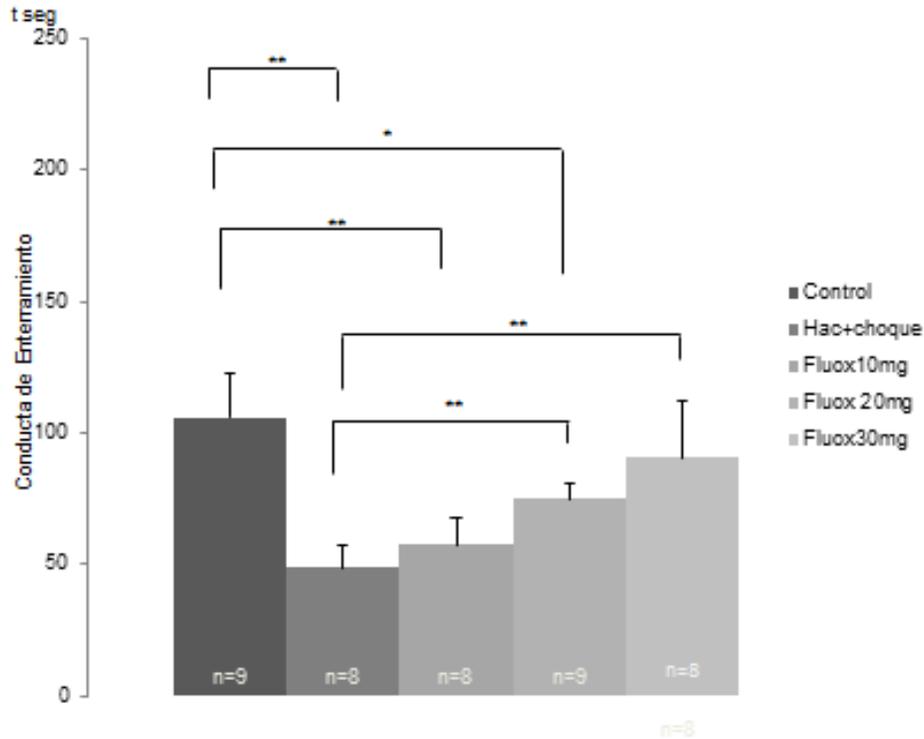


Figura 6. En esta figura se muestra el efecto de la administración crónica de clorhidrato de fluoxetina, sobre la conducta de enterramiento expresada en segundos (media \pm EE), en animales sometidos a dos condiciones de estrés (choque eléctrico y hacinamiento). El fármaco se administró vía oral durante diez días consecutivos a 10, 20 y 30 mg/kg de peso. Las barras representan el grupo control (n=9), el grupo sometido a 10 días de hacinamiento y un choque eléctrico de 0.7 mA (Hac + choque, n=8). Las tres barras a la derecha representan los grupos de hacinamiento más choque eléctrico tratados farmacológicamente, 10 mg de clorhidrato de fluoxetina (Fluox 10 mg, n=8), 20 mg (Fluox 20 mg, n=9) y 30 mg (Fluox 30 mg, n=8). Prueba U de Mann Whitney para análisis pareado; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

La figura 7 presenta el efecto de la administración crónica de clorhidrato de fluoxetina, VO durante diez días consecutivos, sobre la CE en animales que no fueron sometidos a algún tipo de manipulación experimental (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 15.221$, $p \leq 0.001$). En este experimento, los sujetos no fueron sometidos a ningún tipo de manipulación. Las barras representan el grupo control, y los grupos tratados con 10 mg, 20 mg y 30 mg/kg de fluoxetina, respectivamente (Fig. 7).

Se puede observar claramente, que los animales que recibieron el clorhidrato de fluoxetina a diferentes dosis (10, 20 y 30 mg/kg) y que no fueron sometidos a ningún tipo de manipulación, muestran una disminución de la CE comparado con el grupo sin tratamiento. La disminución de la conducta mostrada es dosis dependiente; el grupo de 20 mg muestra una reducción del 40% y el de 30 mg, 65% comparado con el grupo control (Fig. 7). El análisis del número de choques (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 2.809$, $p \leq 0.421$) y la latencia para iniciar la CE (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 4.521$, $p \leq 0.210$) no muestran diferencias entre grupos. La altura del material de recubrimiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 7.983$, $p \leq 0.046$) muestra diferencias entre el grupo control y el grupo que recibió 30 mg/kg de fluoxetina (U de Mann Whitney, $p \leq 0.011$) así como entre los grupos tratados con 10 y 30 mg/kg (U de Mann Whitney, $p \leq 0.012$) (Tabla 8).

	Número de choques	Latencia	Altura
Control	3.44 ± 0.68	45.77 ± 7.88	3.55 ± 1.02*
Fluoxetina 10 mg	5.37 ± 1.19	68.37 ± 21.94	2.50 ± 0.75*
Fluoxetina 20 mg	4.22 ± 0.67	63.22 ± 15.92	1.88 ± 0.89
Fluoxetina 30 mg	5.28 ± 1.12	29.00 ± 3.85	0.42 ± 0.32*

Tabla 8. Efecto de la administración de 10, 20 y 30 mg/kg de fluoxetina VO, durante 10 días consecutivos en animales sin manipulación alguna.

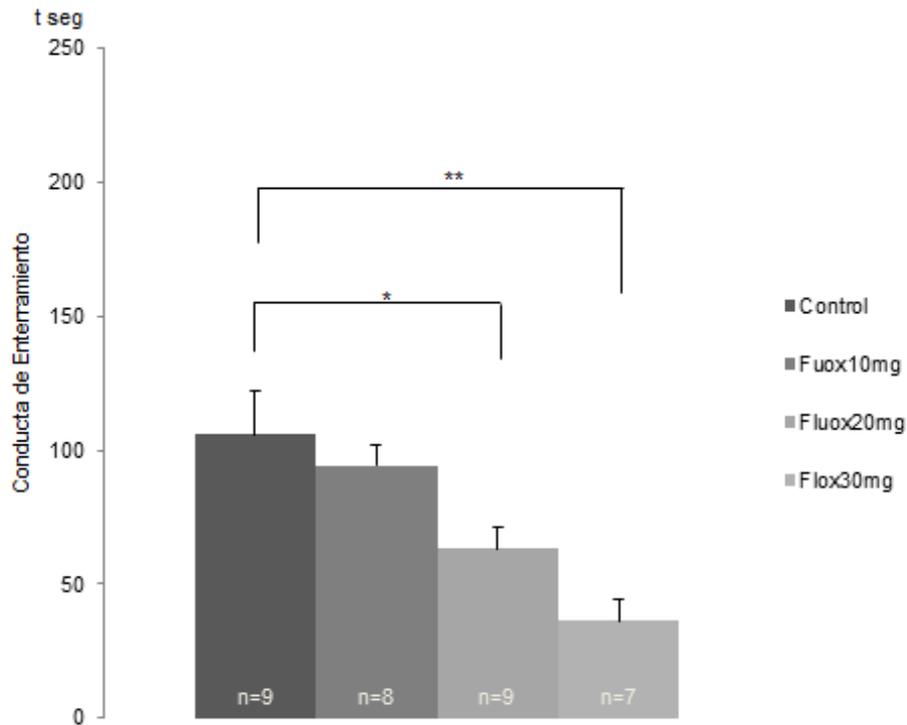


Figura 7. La figura muestra el efecto de la administración crónica de clorhidrato de fluoxetina, vía oral (VO) durante 10 días consecutivos, sobre la conducta de enterramiento expresada en segundos (media \pm EE). En este experimento, los sujetos no fueron sometidos a ningún tipo de manipulación. Las barras representan el grupo control (n=9), el grupo de 10 mg de clorhidrato de fluoxetina (Fluox 10 mg, n=8), el grupo de 20 mg (Fluox 20 mg, n=7) y el grupo el grupo de 30 mg (Fluox 30 mg, n=8). Prueba U de Mann Whitney para análisis pareado; * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$.

En la figura 8 se presenta el efecto de la administración crónica de clorhidrato de fluoxetina, vía oral durante diez días consecutivos, sobre la CE en animales sometidos a diez días de hacinamiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 9.307$, $p \leq 0.009$). Las barras representan el grupo control, el grupo sometido a diez días de hacinamiento y el grupo de 20 mg.

En esta figura se observa que el grupo al que se le administró clorhidrato de fluoxetina presentó una disminución estadísticamente significativa, en la CE, comparado con el grupo que estuvo en las mismas condiciones pero que no recibió el fármaco (Fig. 8). La disminución es del 53.3%. Al comparar la CE del grupo control contra el grupo de 20 mg no se encuentran diferencias estadísticamente significativas (Fig. 8). El análisis del número de choques (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 1.656$, $p \leq 0.436$), la latencia para iniciar la CE (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 2.848$, $p \leq 0.240$) no muestra diferencias entre grupos. La altura del material de recubrimiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 9.958$, $p \leq 0.006$) es diferente, estadísticamente hablando, entre el grupo control y el grupo tratado con 20 mg/kg de fluoxetina (U de Mann-Whitney, $p \leq 0.022$) también se observa diferencia entre el grupo sometido a diez días de hacinamiento y el grupo expuesto a la misma condición y que recibió el fármaco (U de Mann-Whitney, $p \leq 0.012$) (Tabla 9).

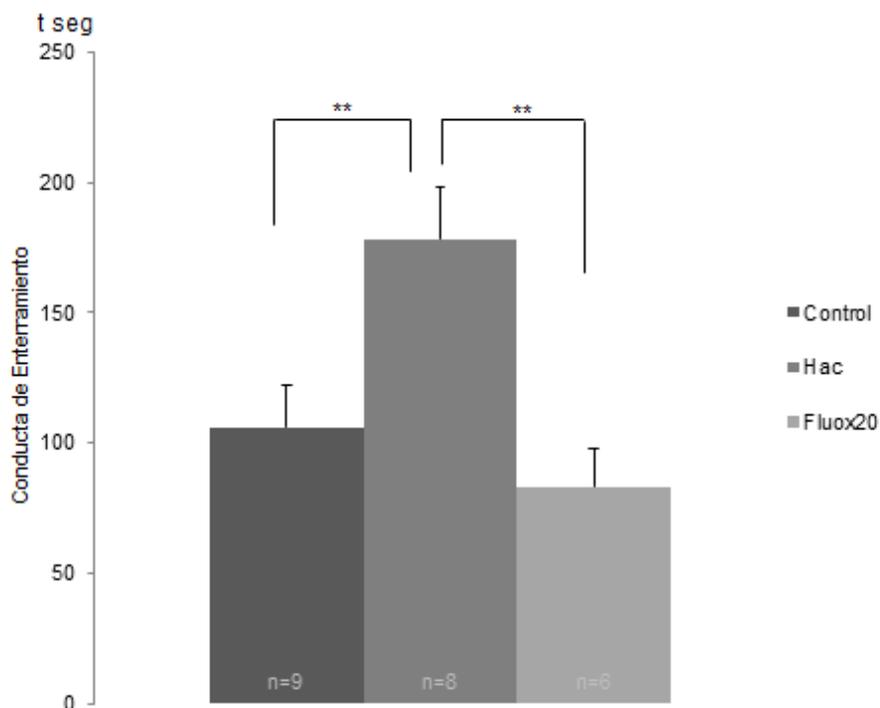


Figura 8. En la figura se presenta el efecto de la administración crónica de clorhidrato de fluoxetina, sobre la conducta de enterramiento expresada en segundos (media \pm EE), en animales sometidos a diez días de hacinamiento. El fármaco se administró vía oral durante diez días consecutivos a 20 mg/kg de peso. Las barras representan el grupo control (n=9), el grupo sometido a 10 días de hacinamiento (Hac, n=8) y el grupo de 20 mg (Fluox 20 mg, n=6). Prueba U de Mann Whitney para análisis pareado; ** $p \leq 0.01$.

	Número de choques	Latencia	Altura
Control	3.44 \pm 0.68	45.77 \pm 7.88	3.55 \pm 1.02*
Hacinamiento	5.00 \pm 1.16	128.00 \pm 42.52	2.25 \pm 1.33*
Fluoxetina 20 mg	4.50 \pm 0.67	67.33 \pm 13.43	0.66 \pm 0.36*

Tabla 9. Efecto de la administración de 20 mg/kg de fluoxetina VO, durante diez días consecutivos en animales sometidos a diez días de hacinamiento.

La figura 9 presenta el efecto de la administración crónica de clorhidrato de fluoxetina, VO durante 10 días consecutivos, sobre la CE en animales sometidos a un choque eléctrico (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 11.127$, $p \leq 0.003$). Las barras representan el grupo control, el grupo sometido a choque eléctrico 0.7 mA y finalmente, el grupo de 20 mg de clorhidrato de fluoxetina.

En la figura 9 se muestra un aumento estadísticamente significativo, en la CE, en el grupo que recibió el clorhidrato de fluoxetina, comparado con el grupo al que se le administro el choque eléctrico pero que no recibió el fármaco (Fig. 9). El aumento observado es del 43% (Fig. 9). Se puede observar, además, que los niveles de CE del grupo control y el grupo que recibió el fármaco no muestran diferencia estadísticamente significativa. El análisis del número de choques (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 0.946$, $p \leq 0.623$), la latencia para iniciar la CE (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 3.392$, $p \leq 0.183$) y la altura del material de recubrimiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 2.671$, $p \leq 0.263$) se muestran en la tabla 10.

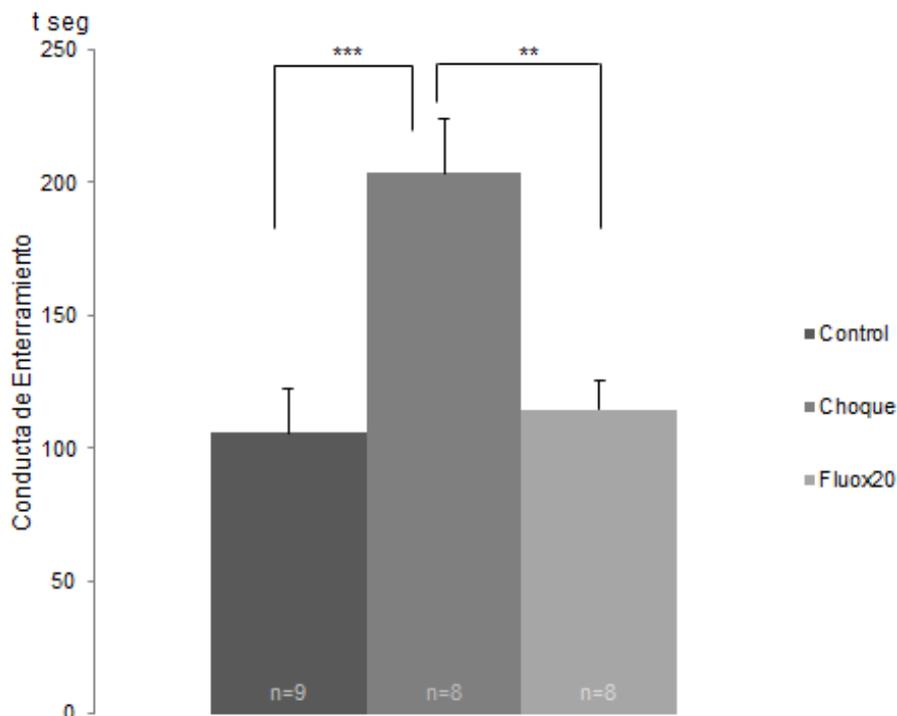


Figura 9. La figura presenta el efecto de la administración crónica de diazepam, sobre la conducta de enterramiento expresada en segundos (media \pm EE), en animales sometidos a un choque eléctrico. El fármaco se administró vía oral durante cinco días consecutivos a 1mg/kg de peso. Las barras representan el grupo control (n=9), el grupo sometido a choque eléctrico 0.7 mA (Choque, n=8) y el grupo de 1 mg de Diazepam (Dz 1 mg). Prueba U de Mann Whitney para análisis pareado; *** $p \leq 0.001$. NS, No significativo.

	Número de choques	Latencia	Altura
Control	3.44 \pm 0.68	45.77 \pm 7.88	3.55 \pm 1.02
Choque	2.71 \pm 0.84	24.28 \pm 6.34	4.57 \pm 1.23
Fluoxetina 20 mg	3.50 \pm 0.72	69.50 \pm 27.75	2.12 \pm 0.51

Tabla 10. Efecto de la administración de 20 mg/kg de Fluoxetina VO, durante diez días consecutivos en animales sometidos a un choque eléctrico de 0.7 mA.

Efecto de la administración de clorhidrato de imipramina en animales sometidos a hacinamiento, choque eléctrico y a la exposición a ambas condiciones

En la figura 10 se muestra el efecto de la administración crónica de clorhidrato de imipramina administrada por vía oral durante cinco días consecutivos, a las dosis de 10, 20 y 30 mg/kg, sobre la CE en animales sometidos a diez días de hacinamiento y un choque eléctrico (Kruskal Wallis ANDEVA, $H=4.780$, $p \leq 0.31$). Las barras representan el grupo control, el grupo sometido a diez días de hacinamiento más un choque eléctrico de 0.7 mA, y los grupos tratados con imipramina a diferentes dosis, 10, 20 y 30 mg/kg.

En esta figura se puede observar que la administración de clorhidrato de imipramina a los sujetos sometidos a las dos formas de estrés, indujo un incremento de 174% en el grupo de 10 mg, 188% en el grupo de 20 mg y 180% en el grupo de 30 mg en la CE, comparado contra el grupo de animales sometidos a estas dos manipulaciones sin tratamiento (Fig. 10). Es importante subrayar la gran semejanza en los niveles de la CE entre los grupos de animales tratados farmacológicamente, sometidos a ambos eventos (hacinamiento más choque eléctrico) y el grupo control (Fig. 10). El análisis del Número de choques (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 10.332$, $p \leq 0.035$), la latencia para iniciar la CE (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 4.687$, $p \leq 0.320$) y la altura del material de recubrimiento (Kruskal Wallis ANDEVA, $H = 5.176$, $p \leq 0.269$) se muestran en la tabla 11. U de Mann-Whitney muestra diferencia entre el grupo control y el grupo tratado con 30 mg/kg al comparar la latencia para iniciar la CE.

	Número de choques	Latencia	Altura
Control	3.44 ± 0.68*	45.77 ± 7.88	3.55 ± 1.02
Hacinamiento+choque	3.11 ± 0.73*	61.22 ± 28.21	2.05 ± 0.65
Imipramina 10 mg	6.12 ± 1.05*	136.25 ± 60.98	4.12 ± 0.86
Imipramina 20 mg	3.65 ± 0.90*	44.11 ± 13.36	3.27 ± 1.00
Imipramina 30 mg	5.00 ± 0.85	83.87 ± 22.76	2.00 ± 0.78

Tabla 11. Efecto de la administración de 10, 20 y 30 mg/kg de Imipramina VO, durante 10 días consecutivos en animales expuestos a Hacinamiento de diez días y un choque eléctrico de 0.7 mA.

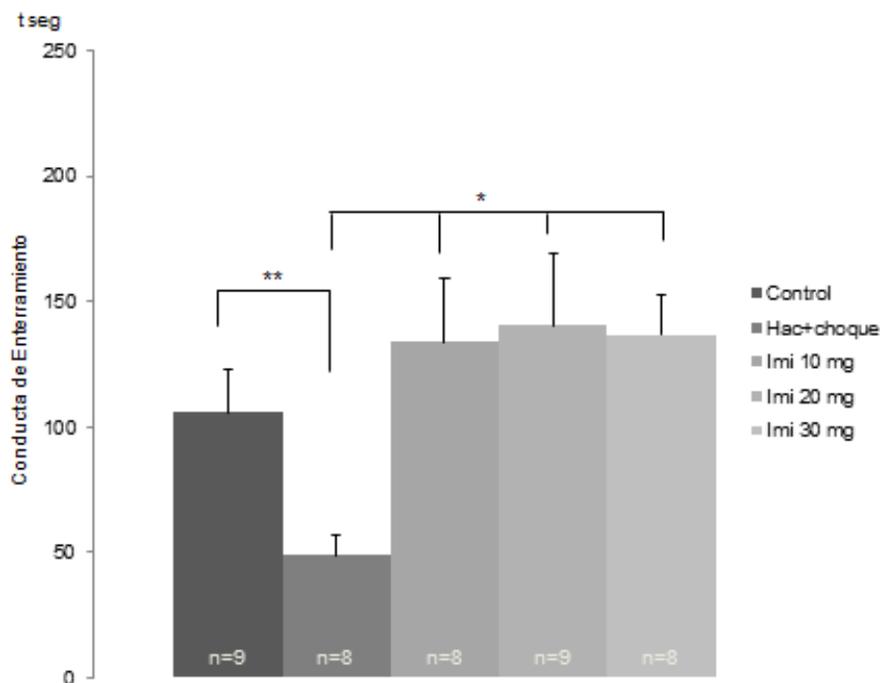


Figura 10. En esta figura se muestra el efecto de la administración crónica de clorhidrato de imipramina, sobre la conducta de enterramiento expresada en segundos (media ± EE), en animales sometidos a dos condiciones de estrés (choque eléctrico y hacinamiento). El fármaco se administró vía oral durante 5 días consecutivos a 10, 20 y 30 mg/kg de peso. Las barras representan el grupo control (n=9), el grupo sometido a diez días de hacinamiento y un choque eléctrico de 0.7 mA (Hac + choque, n=8). Las tres barras a la derecha representan los grupos de hacinamiento más choque eléctrico tratados farmacológicamente, 10 mg de clorhidrato de imipramina (Imi 10, n=8), 20 mg (Imi 20, n=9) y 30 mg (Imi 30, n=8). Prueba U de Mann Whitney para análisis pareado; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, el hacinamiento durante diez días, fue capaz de producir un aumento de 69.5% en los niveles de la CE comparado con los sujetos controles (Fig. 1). Así mismo, se pudo observar que la aplicación de un choque eléctrico de baja intensidad (0.7 mA) también fue capaz de producir un aumento prominente en la CE de 93%. Sin embargo, la combinación de ambas manipulaciones provocó una reducción considerable del 75% y 72% en los niveles de la CE con respecto a los grupos de hacinamiento y choque eléctrico, respectivamente (Fig.1). Esta reducción en la conducta alcanza, incluso niveles menores que la observada en el grupo de animales control, es decir aquellos animales probados en el modelo de enterramiento sin haber sido sometidos a manipulación previa alguna (Fig. 1). En el caso de los animales control, es posible suponer que la conducta registrada expresa el tono basal de los individuos y no lo que algunos autores han considerado como “ansiedad normal” (De Boer y Koolhaas, 2003).

Por otra parte, es también plausible sugerir que el aumento de la CE en los sujetos hacinados o tratados con un choque eléctrico, constituye una respuesta extraordinaria ante un estímulo extraordinario (Saldívar-González *et al.*, 2010), lo que sugiere que este fenómeno no está relacionado con una respuesta de ansiedad, sino con una estrategia conductual adaptativa (Fig.1). Sin embargo, la incapacidad de expresar la CE inducida por la combinación de dos eventos causantes de estrés parece reflejar, la ruptura de los mecanismos que participan en la mediación de esta respuesta adaptativa, (la CE) frente a estímulos del ambiente. Para alcanzar este efecto es necesario combinar dos tipos de manipulaciones experimentales, una de carácter crónico, el hacinamiento de diez días, la otra de carácter agudo, la aplicación de un choque eléctrico, 90 segundos antes de estudiar la respuesta emocional de la rata. Este fenómeno no está

descrito en la literatura disponible y, desde nuestro punto de vista, constituye uno de los principales hallazgos de esta investigación.

Los resultados del presente trabajo se pueden resumir de la siguiente manera:

- a) Los animales probados en el modelo de Treit reflejan el nivel basal de la CE que puede ser considerado como la expresión del tono emocional basal de la rata.
- b) El incremento en la CE inducido por las experiencias previas generadoras de estrés (crónica, el hacinamiento y aguda, la aplicación del choque eléctrico).
- c) La reducción de la conducta de enterramiento mediante la combinación del hacinamiento y el choque eléctrico.
- d) El bloqueo de esta reducción por la administración de benzodiazepinas y antidepresivos de manera crónica.

De acuerdo con la evidencia reportada, el modelo de enterramiento defensivo condicionado propuesto por Treit y Pinel, es un instrumento propuesto originalmente para medir la ansiedad en roedores (Saldívar-González *et al.*, 2010; Arakawa, 2007; De Boer *et al.*, 2003). Se propuso para el estudio de sustancias con potencial ansiolítico en humanos (De Boer *et al.*, 2003). Además, se ha reportado que puede reflejar cambios en el tono emocional por manipulaciones no farmacológicas (Saldívar-González *et al.*, 2010). El modelo se basa en la observación de la CE que consiste en un conjunto de movimientos estereotipados de la rata, orientados a cubrir con el aserrín del suelo de la caja el electrodo a través del cual el animal recibió un choque de 0.3 mA, la cual se observa durante 10 minutos y se expresa en segundos. Además se registra el número de choques recibidos, la latencia de la CE y la altura que alcanza el material de recubrimiento. De acuerdo con el dogma clásico, niveles altos de CE reflejan ansiedad y niveles bajos de CE se asocian con ansiólisis (Arakawa, 2007; Saldívar-González *et al.*, 2010).

En estudios previos se había reportado un aumento en los niveles de la CE inducido por manipulaciones agudas. De acuerdo con lo reportado, el incremento

de los niveles de estrés se asoció con la exposición de ratas a estrés social y con la manipulación de la inyección intraperitoneal de solución salina. En todos estos casos, la manipulación sugiere que un evento agudo inductor de estrés es capaz de modificar la respuesta emocional basal de los individuos y expresar una respuesta rápida a la demanda del ambiente. El aumento de la CE en el caso de los sujetos sometidos a estrés social fue bloqueado de manera dosis dependiente (2.5 y 5.0 mg/kg) por la administración de flumazenil, agonista inverso del receptor benzodiazepínico y de una dosis subóptima de diazepam [(0.25 mg/kg) (Saldívar-González *et al.*, 2010)]. En el caso de la inyección intraperitoneal se demostró que flumazenil redujo el aumento de la CE (Saldívar-González *et al.*, 2010).

El hecho de que la administración de flumazenil sea capaz de reducir la CE, de manera dosis dependiente, sugiere que el receptor benzodiazepínico participa en la mediación del aumento de la CE en sujetos sometidos a un evento de estrés social inductor de estrés. Además, el bloqueo en el aumento de los niveles de la CE inducido por la inyección intraperitoneal de una dosis subóptima de diazepam, demuestra que el receptor benzodiazepínico se encuentra en un estado de afinidad incrementado y que esta modalidad de funcionamiento es capaz de modificarse de manera rápida (Saldívar-González *et al.*, 2010). En resumen, la evidencia parece sugerir que el receptor benzodiazepínico participa en la mediación del aumento de la CE en animales sometidos de manera aguda a eventos inductores de estrés. Este fenómeno se puede explicar sobre la base de una reducción de la capacidad inhibitoria intrínseca del complejo del receptor GABA/benzodiazepínico.

Por otra parte, se ha reportado que la aplicación de un choque eléctrico de intensidad leve en las patas de los roedores se ha utilizado como estímulo desencadenante de respuestas relacionadas con la mediación del estrés (Jaggi, 2011). Así, se ha demostrado que la aplicación de un choque eléctrico en las patas de ratas induce un aumento de triptófano, precursor de serotonina (Pawlak

et al., 2000). Recientemente se ha observado que la administración de agonistas del receptor de serotonina (5HT_{1A}), como el 8-OH-DPAT, producen un aumento significativo en los niveles del factor liberador de corticotropina (*corticotropine releasing factor CRF*), un péptido de 41 aminoácidos liberado por el hipotálamo ventromedial al sistema porta-hipofisiario, que a su vez promueve la secreción de corticotropina (ACTH). Ambos mecanismos son fundamentales en la organización de respuestas frente al estrés (Medeiros, Cartolano y McDonald, 2014). Lo anterior, sugiere que el *foot shock* puede ser utilizado como un instrumento para inducir estrés agudo en roedores (Haj-Mirzaian *et al.*, 2014). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio (Fig. 1).

El alojamiento de los animales bajo determinadas condiciones ambientales puede alterar la conducta y el estado fisiológico y bioquímico. Se ha observado que el hacinamiento de ratas produce un aumento de corticosterona en plasma (Slezak *et al.*, 2014). Los corticosteroides (grupo de hormonas al que pertenece la corticosterona) actúan a través de receptores específicos de mineralocorticoides y glucocorticoides localizados en estructuras cerebrales, como el hipocampo y la amígdala que participan en la regulación del miedo y la ansiedad (Dronjak *et al.*, 2004). Muchas de las alteraciones observadas durante el alojamiento en grupo de varios individuos en espacios pequeños, han demostrado la capacidad de éste para producir estrés psicosocial en roedores (Dronjak *et al.*, 2004). Investigaciones previas han llegado a la conclusión de que el hacinamiento puede ser un factor de estrés significativo, capaz de alterar simultáneamente la conducta, la frecuencia cardíaca y las concentraciones de corticosterona en animales sometidos a estas condiciones (Nephew *et al.*, 2005). Esta evidencia concuerda con los datos obtenidos en el presente estudio que se refiere al incremento en la CE del 69.5% en ratas sometidas a diez días de hacinamiento (Fig. 1).

De acuerdo con los criterios clínicos de la ansiedad, una característica importante para el diagnóstico se refiere a la disfuncionalidad social, laboral o familiar de los individuos (Nade, Kawale, Nak y Yadav, 2009). La falta de respuesta o la ausencia

de una respuesta clara en los niveles de la CE en ratas, se puede interpretar como disfuncionalidad conductual, es decir, incapacidad para emitir respuestas que le resultan adaptativas al individuo. Por otra parte, el estrés afecta al organismo en su conjunto (cuerpo y mente) en función de su duración (agudo o crónico) y tipo de exposición (predecible o impredecible). Aún con ello, en cierta medida las respuestas al estrés resultan adaptativas en la medida que permiten al individuo obtener mejores resultados individuales en su relación con el entorno y sus congéneres (Chakravarty, Pathak, Maitra, Khandelwal, Chandra y Kumar, 2014). Por lo tanto, se puede sugerir que el aumento de la CE (Figs. 2 y 6) es adaptativo, mientras que la ausencia de respuesta no lo es (Fig.1, 2 y 6). En la presente investigación se muestra claramente como la administración de diazepam, fluoxetina e imipramina restablece la capacidad adaptativa de los sujetos al permitir la expresión de la respuesta de enterramiento defensivo condicionado (Fig. 2, 6 y 10, respectivamente).

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se presenta evidencia que apoya la idea de que la combinación de dos formas de estrés (agudo y crónico) impide a los animales la expresión de la CE (Figs. 1, 2, 6 y 10). De acuerdo con lo encontrado en la literatura especializada, no existen referencias de un diseño experimental parecido al propuesto en la presente investigación. La gran mayoría de los estudios orientados al análisis del estrés se basan en el estudio de respuestas conductuales en condiciones basales o en un solo evento inductor de estrés. En el presente diseño experimental, se estudia la disminución de una respuesta (CE) que forma parte del repertorio conductual natural de las ratas (Whishaw y Kolb, 2005). Tanto el hacinamiento como el choque eléctrico en las patas (*foot shock*), constituyen manipulaciones experimentales de las que existe evidencia acerca de su eficacia como inductores de respuestas es incrementadas (*ver arriba*). Además, es posible sugerir que la expresión de la CE defensivo, sin manipulación previa, refleja el tono emocional de la rata de manera directa en condiciones normales. Esto, se ha interpretado de forma que niveles bajos del tiempo de la CE refleja bajos niveles de ansiedad experimental en la rata (Treit,

1985). Por el contrario, un tiempo prolongado de la CE se asocia con niveles incrementados de ansiedad en ratas (Treit *et al.*, 1981). Por lo tanto, es posible proponer que la combinación de dos procedimientos estresantes; el hacinamiento y el *foot shock* proveen de un modelo animal más parecido a la ansiedad que se observa en humanos. Además, los resultados obtenidos permiten proponer la relatividad de la respuesta conductual clásica observada en el modelo de Treit. La reducción de la CE observada después de combinar el hacinamiento y el choque eléctrico no representa ansiólisis (de acuerdo con el dogma clásico del modelo), sino congelamiento (*freezing*), conducta asociada con niveles altos de estrés. La administración de diazepam, fluoxetina e imipramina fue capaz de revertir la inmovilidad inducida por la combinación de hacinamiento y choque eléctrico. Cabe resaltar que en este trabajo cuando se habla de *freezing* se hace referencia a la disminución parcial de la conducta, no a la desaparición total de ella.

En el presente trabajo se puede ver como la reducción de la CE por combinación de dos estímulos transforma una conducta defensiva activa en una conducta defensiva pasiva (*freezing*) (Fig. 1). Esta inmovilidad total se puede definir como una respuesta de comportamiento innato de inactividad profunda. Representa una falta de capacidad para responder al medio ambiente y, regularmente, se presenta durante enfrentamientos de presa-depredador (Souza da Silva, Coimbra y Menescal-de-Oliveira, 2013). La respuesta de inmovilidad puede aumentar las posibilidades de supervivencia de la presa debido a que el depredador requiere que la presa luche para continuar con el ataque (Souza da Silva *et al.*, 2013). La inmovilidad observada en el presente estudio, cuando se combinan dos eventos estresantes, parece no conferirle al sujeto una ventaja adaptativa, es decir, la disminución de la conducta resulta en una cierta disfuncionalidad del animal. Restablecer la capacidad de expresar la CE significa restituir la funcionalidad conductual de la rata. Disponer de un instrumento de estas características permite el estudio de aspectos relacionados a la neurobiología de la ansiedad.

Es importante señalar que la gran mayoría de trabajos publicados sobre el efecto del clorhidrato de imipramina, fluoxetina y diazepam sobre la CE contradicen los resultados obtenidos en el presente estudio (Figs. 2, 6 y 10). Casi la totalidad de los artículos reportan que la administración de estos fármacos resulta en una reducción en los niveles de la CE, efectos que se han interpretado como inductores de ansiólisis, (Saldívar-González *et al.*, 2008; Filaferro, Ruggieri, Novi, Calò, Micioni Di Bonaventura *et al.*, 2013; Rodríguez-Landa, García-Ríos, Cueto-Escobedo, Bernal-Morales y Contreras, 2013). A continuación presentamos evidencia que explica este fenómeno.

Diferentes investigaciones han estudiado el efecto de la administración por VO de diazepam en roedores. Así, se dispone de evidencia que muestra que la administración de 3 mg/kg de diazepam aumenta la exploración en los brazos abiertos, medido en segundos de permanencia en el laberinto en cruz elevado (Violle, Balandras, Le Roux, Desor y Schroeder, 2009). En otro experimento, se observó que la administración de 1 mg/kg de Dz a un grupo de ratas, inducía una disminución en la latencia para abandonar el brazo abierto del laberinto, comparado con el tiempo que pasan en el mismo sitio los animales que no reciben el fármaco (Duzzioni, Calixto, Duarte y De Lima, 2008). En nuestro estudio, se muestra que cuando los animales no son sometidos a algún tipo de manipulación y reciben diazepam, se observa una disminución en los niveles de la CE (Fig. 8), estos resultados son dosis dependientes y concuerdan con la evidencia antes descrita, es decir, actúan sobre receptores benzodiazepínicos en el estado basal, lo que reduce a su vez el tono emocional basal del individuo (Fig. 8).

En concordancia con los resultados del presente estudio, algunos investigadores han presentado evidencia que demuestra que el hacinamiento en ratas produce un aumento de corticotropina y corticosterona en plasma (Fig. 1) (Sladana, Nataša, Ljubica y Varagić, 2007). Así como, que estos cambios son revertidos mediante la

administración IP de diazepam (Sladana et al., 2007). En otra investigación se encontró que la administración aleatoria de choques eléctricos (2 mA) de duración variable, en periodos de 1 hora, durante 21 días, induce disfunción cognitiva, aumento en los niveles de glicemia y corticosterona, así como úlceras gástricas. Esto se concluyó al probar a los animales en los modelos de laberinto en cruz elevado y de nado forzado, en ratas (Nade *et al.*, 2009). La administración intraperitoneal (IP) de 1 mg/kg de diazepam de manera crónica (durante 21 días, 1 hora antes de los choques en las patas) disminuye significativamente los niveles de glucosa y corticosterona en sangre y también disminuye el índice de úlceras gástricas (Nade *et al.*, 2009). De la misma manera, la administración repetida de choques eléctricos de 0.8 mA de intensidad, con intervalos de duración de 10 segundos administrados durante 21 días en las patas de ratones, aumenta la conducta de congelamiento (*freezing*) y el nivel de ansiedad; a esta conclusión se llegó después de probar a los animales en el modelo de campo abierto y el laberinto en cruz elevado. Estos efectos son revertidos por la administración intraperitoneal de 0.25 mg/kg de diazepam (Li, Murakami, Wang, Maeda y Matsumoto, 2006). Estos datos coinciden con los resultados acerca del efecto de la administración de diazepam en ratas sometidas a choque eléctrico, es decir un solo evento estresante (Fig. 4).

De acuerdo con lo observado, en el presente estudio, la combinación de hacinamiento más choque eléctrico produce una reducción de la CE (Fig. 1). La administración de diazepam VO (1 y 3 mg/kg) es capaz de restablecer la CE, al producir un aumento en los niveles de ésta (Fig. 2) y causar un aumento por arriba de la basal a dosis altas [(5mg/kg) (Fig. 2)]. Por otra parte, a diferencia de lo descrito en el experimento en el que se administró diazepam a ratas expuestas a estrés crónico y agudo (Fig. 2), encontramos que la administración de diazepam a animales que no fueron sometidos a manipulaciones previas, inductoras de estrés fue eficaz para reducir la CE [(control basal) (Fig.3)]. La administración de diazepam, también produjo una disminución en la CE en animales sometidos a un solo evento estresante; bien choque eléctrico (Fig. 4) o bien hacinamiento (Fig. 5).

De acuerdo con estas respuestas conductuales, se puede sugerir que el receptor Benzodiazepínico participa en la mediación de dos tipos aparentemente antagónicos de respuestas; reducción de la CE en los animales del grupo control (Fig. 3) y en los grupos sometidos a un solo evento inductor de estrés [(hacinamiento o choque eléctrico (Figs. 4 y 5)] y aumento de los niveles de la CE en los sujetos sometidos a dos eventos inductores de estrés (Fig. 2). Esta evidencia sugiere que el estado del animal, producido por experiencias adversas previas, parece modificar las características estructurales y funcionales del complejo del receptor GABA/benzodiazepínico. En investigaciones previas se demostró que estas modalidades de conformación del complejo del receptor se pueden observar después de la aplicación de un estímulo doloroso (la manipulación de la inyección intraperitoneal), por exposición a estrés social (Saldívar-González *et al.*, 2010) o durante la supresión de alcohol en ratas habituadas al consumo crónico de éste (Cagetti, 2004).

Por otra parte, se ha reportado que la administración del agonista inverso de receptor benzodiazepínico flumazenil, es capaz de revertir el incremento de la CE inducido por la inyección intraperitoneal o por la exposición al evento social estresante (Saldívar-González *et al.*, 2010). De la evidencia presentada, y de acuerdo con los resultados de la presente investigación (Figs. 2, 3, 4 y 5) se puede sugerir que el complejo del receptor benzodiazepínico tiene la capacidad de participar en respuestas inhibitorias por activación del canal de Cl^- y aumento de la polaridad de la membrana neuronal mediante el incremento del flujo de Cl^- . Por otra parte, también es plausible sugerir la activación de un mecanismo inverso que participa en la mediación de conductas excitatorias por reducción de la apertura del canal, disminución del flujo de Cl^- mediante la disminución de la función inhibitoria intrínseca del complejo del receptor GABA-Benzodiazepínico. Este efecto se ha relacionado con la actividad de agonistas inversos exógenos (betacarbolinas, flumazenil) o endógenos (DBI) del receptor benzodiazepínico (Gouzer, Specht, Allain, Shinoe y Triller, 2014). Ahora bien, el aumento en la CE

observado en sujetos tratados con 5 mg de diazepam, podría comprenderse como un efecto liberador sobre circuitos neuronales excitatorios en las terminales cortas de neuronas gabaérgicas que actúan en la condición basal reduciendo la actividad de estos circuitos (núcleo estriado, zonas de la corteza frontal y prefrontal).

Además, se ha presentado evidencia que sugiere la existencia de una subpoblación de receptores benzodiazepínicos que a diferencia del efecto inhibitorio clásico, participa en la mediación de efectos excitatorios (Pinacho-García, 2010; Pinacho-García *et al.*, 2009; Saldívar-González *et al.*, 2006). De acuerdo con los resultados obtenidos en estos estudios, se encontró que una subpoblación de aproximadamente el 25% de los sujetos tratados con diazepam, presentaban niveles aumentados en la CE en el modelo de Treit y reducción en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del modelo del laberinto elevado en cruz (Saldívar-González *et al.*, 2006). Es decir lo opuesto a lo referido en la literatura respecto al efecto de la administración de diazepam en estos modelos. (Pinacho-García, 2010; Pinacho-García *et al.*, 2009; Saldívar-González *et al.*, 2006). Además, se ha reportado, en humanos un efecto paradójico inducido por la administración de benzodiazepinas: agitación psicomotriz, ansiedad, insomnio, alucinaciones, irritabilidad, conductas agresivas. También, se ha descrito que las benzodiazepinas con propiedades antiepilépticas pueden exacerbar la actividad convulsiva (Brunton *et al.*, 2012; Mancuso, Tanzi y Gabay, 2004). De tal suerte, se apoya la idea acerca de la posibilidad de funcionamiento atípico del complejo GABA/benzodiazepínico en modo excitatorio en una subpoblación de individuos (Saldívar-González *et al.*, 2006) (Figs. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Estos datos sugieren que además de la conformación del receptor inducida por experiencias negativas (Figs. 2, 3 y 4) un grupo de individuos, presenta características constitucionales de vulnerabilidad a la ansiedad relacionada con un cierto déficit de la transmisión inhibitoria asociada con el complejo del receptor GABA/Bz (Saldívar González *et al.*, 2006).

Por otra parte, estudios previos, muestran que la administración de fluoxetina (FI) tiene un efecto ansiolítico en ratas expuestas a la condición de hacinamiento. Animales hacinados durante 21 días, fueron estudiados en el modelo de Novedad de Alimentación Suprimida y se encontró que el tratamiento con fluoxetina produce una latencia menor de inicio de la alimentación en un lugar novedoso, comparado con el tiempo de latencia de los sujetos no tratados (Greene, Banasr, Lee, WarnerSchmid y Duman, 2009). En otra investigación, se demostró que la administración de fluoxetina a dosis de 5, 10 y 20 mg/kg administrada vía IP durante 14 días, produce un aumento significativo del umbral de la conducta de congelamiento inducido por estimulación eléctrica en la columna dorsolateral y lateral de la sustancia gris periacueductal en ratas (Borelli, Nobre, Brandão y Coimbra, 2004). De acuerdo con los resultados de estos trabajos se sugiere que la administración de FI tiene un efecto ansiolítico en ratas previamente manipuladas con el propósito de inducir la expresión de conductas relacionadas con la ansiedad (Figs. 6, 8 y 9). La administración de 20 mg/kg de fluoxetina evita la conducta de congelamiento y restaura la actividad locomotora en la prueba de condicionamiento aversivo de lugar, estos efectos no fueron observados en los animales controles. Con estos resultados se puede concluir que la fluoxetina administrada de manera aguda revierte las conductas de pánico, específicamente el congelamiento (*freezing*) y por lo tanto restaura la actividad locomotora (Zienowicz, Wislowska-Stanek, Lehner, Taracha, Skòrzewska, Bidziński *et al.*, 2007). Así, existe evidencia que concuerda con los hallazgos de este estudio, acerca del efecto ansiolítico de FI, cuando se administra con el propósito de bloquear una respuesta conductual a un solo evento inductor de estrés (Figs. 8 y 9).

Es importante señalar que la administración de FI, tal y como sucede con Dz, es capaz de reducir la CE en los grupos control (Fig. 7) y en los grupos sometidos a una sola experiencia inductora de estrés (Figs. 8 y 9). La administración de FI, sin embargo, produjo un incremento en la CE en los sujetos sometidos a dos eventos estresantes (Fig. 6). Esta evidencia sugiere que el transportador de serotonina se

encuentra en un modo diferente de funcionamiento de acuerdo con la experiencia previa; sujetos en condiciones basales, sometido a un solo evento estresante o bien animales sujetos a dos eventos inductores de estrés [(Figs. 7, 8 y 9) (Spasojevic, Jovanovic y Dronjak, 2015; Medina-Martel, Urbina, Fazzino y Lima, 2013)].

En un estudio se administraron diferentes dosis de Imi (5, 10 y 15 mg/kg, IP) de manera crónica y aguda. Los sujetos fueron probados en el laberinto en T y se midió la actividad locomotora en una superficie con arena. Los resultados muestran que las ratas tratadas con imipramina, de manera crónica y aguda, muestran una disminución en la actividad locomotora, además se reduce la latencia para abandonar el brazo cerrado del laberinto, comparado con el grupo control. Estos resultados abundan, junto con otros, acerca de las propiedades ansiolíticas de Imi en modelos animales de ansiedad (Custódio-Teixeira, Zangrossi y Graeff, 2000). En otro experimento a un grupo de animales se le administró 30 mg/kg de imipramina IP antes de ser sometidos a un diseño experimental de estrés, los ratones fueron sometidos a la prueba de campo abierto, el test de suspensión de cola, nado forzado y prueba de preferencia a sacarosa. Se observó que los animales aumentaron el tiempo de permanencia en el área central del campo abierto, la movilidad en el test de suspensión de la cola y el test de nado forzado, además de aumentar la preferencia por la sacarosa (Ping, Qian, Song y Zhaochun, 2014). Estos datos sugieren que la administración de Imi produce un efecto ansiolítico en roedores.

En otra investigación se sometió a un grupo de ratones al laberinto en cruz elevado, test de nado forzado y al test de suspensión de la cola. Posteriormente se les administró Imi 15 mg/kg VO. Como resultado del tratamiento los animales mostraron un aumento de la movilidad tanto en el test de nado forzado como en el de suspensión de la cola, además se observó un aumento de la movilidad en el test de laberinto en cruz elevado, por lo que se puede concluir que el tratamiento

tuvo efectos ansiolíticos (Fajemiroye, Galdino, Florentino, Da Rocha, Ghedini, Polepally *et al.*, 2014).

De la evidencia anteriormente presentada se puede concluir que la administración de Dz, FI e Imi produce un efecto ansiolítico en modelos de ansiedad crónica y aguda en roedores. Estos resultados concuerdan con una parte de los datos obtenidos en el presente estudio. En particular, la evidencia mostrada en las figuras 4, 5, 8 y 9 que muestran una reducción en la CE inducida por la administración crónica de Dz y FI, respectivamente, en sujetos sometidos a choque eléctrico o hacinamiento o en la condición basal. Es importante señalar que la administración de Dz en los sujetos control, también produjo una reducción en los niveles de la CE (Fig. 3.), la misma respuesta se observa al administrar FI en animales control (Fig. 7). Sin embargo, es importante recalcar, que este trabajo demuestra que la combinación de los dos eventos estresantes: un choque eléctrico y el hacinamiento produce una reducción de la CE (Fig. 1). Aun cuando la exposición de cada uno de ellos por separado induce aumento de la misma (Fig. 1). Éste aumento en la CE es revertido por la administración de Dz y de FI. Lo cual sugiere que en condiciones basales, la CE no refleja por sí misma ansiedad, sino sólo el tono emocional normal de la rata. Tampoco, el aumento de la conducta defensiva de enterramiento en respuesta al choque eléctrico parecería reflejar una conducta relacionada con la ansiedad, sino de manera específica la expresión extraordinaria de esta conducta ante un evento ambiental extraordinario. Sin embargo, el hecho de que los antidepresivos también producen disminución de la CE en los sujetos no sometidos ni a estrés crónico ni agudo, sugiere que actúan sobre receptores capaces de participar en la mediación de la disminución de la CE y modificar, así el tono emocional normal de los animales. Por lo tanto, todo parece indicar que actúan sobre receptores “normales”, no sobre receptores “enfermos”, algo que no ocurre en la depresión, por ejemplo, en cuyo caso los antidepresivos no modifican el estado de los sujetos no deprimidos (Dumont, De Visser, Cohen y Van Garden, 2005). Finalmente, de acuerdo con los datos del

presente trabajo es posible proponer que el presente diseño es útil para discriminar fármacos ansiolíticos potencialmente útiles en el tratamiento sin que estos fármacos afecten el estado de alerta de sujetos sanos.

La reducción en la CE por la combinación de los dos estímulos inductores de estrés es revertida de manera dosis dependiente por la administración crónica de Dz y FI, respectivamente (Fig. 2 y 6). Aún más, la dosis mayor de 5 mg/kg de Dz produce un incremento en los niveles de la CE por arriba de los mostrados por el grupo control (Fig. 6). Estos resultados son únicos, toda vez que en la literatura especializada se reporta un efecto sedante de esta dosis (Panhelainen y Korpi, 2012). Aún más nuestros propios datos apoyan esta evidencia acerca de una reducción importante en los niveles de CE, la dosis de 5 mg/kg produce una reducción importante que alcanza el 73.65% por debajo de los niveles mostrados por los sujetos control en condiciones basales (Fig. 3). La explicación de este fenómeno, desde nuestro punto de vista, es que el hecho de que se presente un aumento de la conducta después de la administración del fármaco, en este caso, no refleja una respuesta aumentada si no, la restauración de la capacidad de respuesta del sujeto (Fig. 2), capacidad pérdida al someter a los animales a la combinación de ambos eventos (Fig. 1).

De los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede observar, además, que la restauración de la conducta es dosis dependiente en el caso del Dz y la FI (Figs. 2 y 6). Sin embargo, en el caso de Imi los resultados no son tan claros puesto que no se comportan de manera dosis dependiente (efecto todo o nada). Este efecto se puede explicar con base en la afinidad del fármaco sobre diferentes tipos de receptores ya que ejerce un efecto inhibitorio sobre los mecanismos de inhibición del transportador de catecolaminas y serotonina, y al efecto antagonista sobre receptores histaminérgicos y muscarínicos (Navarrete y Camarillo, 2013). Mientras que la FI tiene una acción más específica al inhibir la función del

transportador de serotonina (S_{1A}); sensibilizar los receptores serotoninérgicos postsinápticos, y normalizar la actividad serotoninérgica (Ravindran y Stein, 2010). El Dz, por otra parte, tiene una acción muy específica, su interacción con los receptores a $GABA_A$ resulta en un aumento de la frecuencia de apertura de los canales a Cl^- , es decir, potencia la acción inhibitoria del GABA (Brunton *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

1. El hacinamiento produce aumento de la conducta de enterramiento.
2. El choque eléctrico produce aumento de la conducta de enterramiento.
3. La combinación del hacinamiento y el choque eléctrico produce reducción de la conducta de enterramiento.
4. La conducta de enterramiento en el grupo control, sin manipulaciones refleja el tono emocional basal.
5. Las manipulaciones (hacinamiento y/o choque eléctrico) modifican el tono emocional de la rata, medido en el modelo de enterramiento defensivo condicionado.
6. La administración de diazepam revierte de manera dosis dependiente la reducción de la conducta inducida por la combinación del hacinamiento y el choque eléctrico.
7. La administración de diazepam reduce la conducta de enterramiento en el grupo de animales control, sin manipulación.
8. La administración de diazepam reduce el aumento de la conducta inducido por el hacinamiento
9. La administración de diazepam reduce el aumento de la conducta inducido por el choque eléctrico
10. El sitio de unión a benzodiazepinas participa en la mediación de los cambios del tono emocional de la rata, medido en el modelo de enterramiento defensivo condicionado.
11. La administración de fluoxetina revierte de manera dosis dependiente la reducción de la conducta inducida por la combinación del hacinamiento y el choque eléctrico.
12. La administración de fluoxetina reduce la conducta de enterramiento en el grupo de animales control, sin manipulación.
13. La administración de fluoxetina reduce el aumento de la conducta inducido por el hacinamiento
14. La administración de fluoxetina reduce el aumento de la conducta inducido por el choque eléctrico

15. El sistema serotoninérgico participa en la mediación de los cambios del tono emocional de la rata, medido en el modelo de enterramiento defensivo condicionado.
16. La administración de imipramina bloque de manera “todo o nada” la reducción de la conducta de enterramiento inducida por la combinación de hacinamiento más choque eléctrico.

REFERENCIAS

Åhs F, Kragel PA, Zielinski DJ, Brady R Y LaBar KS (2015). Medial prefrontal pathways for the contextual regulation of extinguished fear in humans. *NeuroImage*, 122: 262-271.

American Psychiatric Association (2013). *Diagnostical and Statistical Manual of Mental Disorders* (5° ed.). Washington.

Arakawa H (2007). Ontogenetic interaction between social relationships and defensive burying behavior in the rat. *Physiology & Behavior*, 90: 751–759

Baranyi J, Bakos N y Haller J (2005). Social instability in female rats: The relationship between stress-related and anxiety-like consequences. *Physiology y Behavior*, 84: 511-518.

Bear M, Barry C y Paradiso M (2008). *Neurociencia: la exploración del cerebro* (3° ed.). Barcelona, Editorial Wolters Kluwer Health.

Belo DJ, Constantino ME, Ribeiro A, Reimer E, Lira BM, De Matis ML, Camaro BM, Conceição CDL y Queiroz HM (2012). Outlining new frontiers for comprehension of obsessive-compulsive disorder: a review of its relationship with fear and anxiety. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 34 (Supl1): S81-S103.

Böer U, Noll C, Cierny I, Krause D, Hiemke C y Knepel W (2009). A common mechanism of action of the selective serotonin reuptake inhibitors citalopram and fluoxetine: Reversal of chronic psychosocial stress-induced increase in CRE/CREB-directed gene transcription in transgenic reporter gene mice. *European Journal of Pharmacology*, 633: 33-38.

Borelli KG, Nobre MJ, Brandão ML y Coimbra NC (2004). Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. *Pharmacological Biochemistry Behavior*, 77: 557-566.

Borin M, Petit-Demoulière B, Dhonnchadha BN y Hascöet M (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21: 567-574.

Bossini L, Tavanti M, Lombardelli A, Calossi S, Polizzotto NR, Galli R (2007). Changes in hippocampal volume in patients with post-traumatic stress disorder after sertraline treatment. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 27: 233-235.

Brunton L, Chabner BA y Knollman B (2012). *Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (12ª edición)*. España: McGraw-Hill.

Cagetti E (2004). Altered pharmacology of synaptic and extrasynaptic GABA_A receptor on CA1 hippocampal neurons is consistent with subunits changes in a model of alcohol withdrawal and dependence. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310: 1234-45.

Calabrese F, Molteni R, Racagni G y Riva MA (2009). Neuronal Plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 34 (suppl.1): 208-216.

Calderón-Guzmán D, Juárez-Olguín H, Hernández-García E, Osnaya-Brizuela N, Rivera-Espinosa L, Saldívar González JA (2014). Mechanism of prooxidants in neuroinflammatory processes and clinical manifestations. *Annual Research and Review in Biology*, 4(24): 3949-3961.

Campbell N y Reece J (2007). *Biología*. España: Editorial Panamericana.

Carrier N y Kabbaj M (2012). Testosterone and imipramine have antidepressant effects in socially isolated male but not female rats. *Hormones and Behavior*, 61: 678-685.

Chagas MH, Nardi A, Manfro G, Hetem L, Andrada N, Levitan N, Salum G, Isolan L, Ferrari M y Crippa J (2010). Anxiety and Joint hypermobility association. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 34 (Supl 1): S53-S68.

Chakravarty S, Pathak S, Maitra S, Khandelwal N, Chandra KB y Kumar A (2014). Epigenetic Regulatory Mechanisms in Stress-Induced Behavior. *International Review of Neurobiology*, 115: 117-154.

Chocyk A, Majcher-Maślanka I, Dudys D, Pryborowska A & Wędzony K (2013). Impact of early-life stress on the medial prefrontal cortex functions – a search for the pathomechanisms of anxiety and mood disorders. *Pharmacological Reports*, 65: 1462-1470.

Choy Y, Fyer A y Lipsitz JD (2007). Treatment of specific phobia adults. *Clinical Psychology Review*, 27: 266-286.

Custódio-Teixeira, Zangrossi Jr H y Graeff FG (2000). Behavioral effects of acute and chronic imipramina in the elevated T-Maze model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65: 571-576.

Cryan JF y Holmes A (2005). Model organisms: the ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. *Nature Reviews & Drug Discovery*, 4: 775-790.

De Boer SF y Koolhaas JM (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology*, 463:145–61.

De Kloet ER (2003). Hormones, brain and stress. *Endocrinology and Regulation*, 37: 51-68.

Dronjak S, Gavrilović L, Filipović D y Radojčić M (2004). Immobilization and cold stress affect sympatho-adrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiology & Behavior*, 81: 409-415.

Dumont GJ, De Visser SJ, Cohen AF y Van Garderen MA (2005). Biomarkers for the effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 59: 495-510.

Durand M y Barlow D (2007). *Psicopatología: un enfoque integral de la psicología anormal (4° ed.)*. México, Editorial Thompson.

Duzzioni, M., Calixto, A., Duarte, F. y De Lima, T., (2008). Modulation of anxiety in rats evaluated in the elevated T-maze: evidence of the relationship between substance P and diazepam. *Behavior & Brain Research*, 187: 140-145.

Fajemiroye JO, Galdino PM, Florentino IF, Da Rocha FF, Ghedini PC, Polepally PR, Zjawiony JK y Costa EA (2014). Plurality of anxiety and depression alteration mechanism by oleanolic acid. *Journal of Psychopharmacology*, ID 0269881114536789.

Filaferro M, Ruggieri V, Novi C, Calò G, Micioni Di Bonaventura MV, Sandrini M y Vitale G (2013). Functional antagonism between nociceptin/ orphanin FQ and corticotropin-releasing factor in rat anxiety-related behaviors: Involvement of the serotonergic system. *Neuropeptides*, 48: 189-197.

Furtado M y Katzman M (2015). Neuroinflammatory pathways in anxiety, posttraumatic stress and obsessive compulsive disorders. *Psychiatry Research*, 229: 37-48.

Gadek-Michalska A y Bugajski J (2003). Repeat handling, restraint or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. *Physiology & Pharmacology*, 54: 449-459.

Galeffi F, Sah R, Pond BB, George A y Schwartz RD (2004). Changes in intracellular chloride after oxygen-glucose deprivation of the adult hippocampal slice: effect of diazepam. *The Journal of Neuroscience*, 24: 4478-4488.

Galvao MOL, Coimbra RS, Kawakami SE, Tufika S y Schecki D (2009). Paradoxical sleep and stress response. *Psychoneuroendocrinology*, 34: 1176-1183.

García-García AL, Newman-Tancredi A y Leonardo ED (2014). 5-HT₁ receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology*, 231: 623-636.

Geronikolou, SA, Chamakou A, Mantzou A, Chrousos G y Kanaka-Gantenbein C (2015). Frequent cellular phone use modifies hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to a cellular phone call after mental stress in healthy children and adolescents: A pilot study. *Science of The Total Environment*, 536: 182-188.

Gimeno AD, Ferre NF (2011). Protocolo de diagnóstico y tratamiento en el abuso y dependencia de las benzodiacepinas. *Medecine*, 86: 5835-5838.

Glaser R y Kiecolt-Glaser JK (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Review Immunology*, 5: 243-251.

Gonzalo AC y Van de Kar LD (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of the Pharmacology*, 463: 235-272.

Gouzer G, Specht CG, Allain L, Shinoe T y Triller A (2014). Benzodiazepine-dependent stabilization of GABA(A) receptors at synapses. *Molecular Neuronal Neuroscience*. 63: 101-113.

Greene J, Banasr M, Lee B, Warner-Schmid J y Duman RS (2009). Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: pharmacological and cellular characterization. *Neuropsychopharmacology*, 34: 2459-2468.

Haj-Mirzaian A, Ostadhadi S, Kordjazy N, Dehpour AR y Mehr SE (2014). Opioid/NMDA receptors blockade reverses the depressant-like behavior of foot shock stress in the mouse forced swimming test. *European Journal of Pharmacology*, 735: 26-31.

Henkin Y y Bar-Haim Y (2015). An auditory-neuroscience perspective on the development of selective mutism. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 12: 86-93.

Hunter RG y McEwen BS (2013). Stress and anxiety across the lifespan: structural plasticity and epigenetic regulation. *Epigenomics*, 5: 177-194.

Indovina I, Robbins T, Nuñez-Elizalde A, Dunn B y Bishop S (2011). Fear-Conditioning mechanisms associated with trait vulnerability to anxiety in humans. *Neuron*, 69: 563-571.

Jacob T, Moss S y Jurd R (2008). GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience*, 9: 331-343.

Jaggi AS, Bhatia N, Kumar N, Singh N, Anand P y Dhawan R (2011). A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurology Science*, 32: 993-1005.

Jarne EA, Talarn CA, Armayones RM, Horta FE y Requena VE (2006). *Psicopatología*. Barcelona, Editorial UOC.

Keeton C y Budinger M (2012). Social Phobia and Selective Mutism. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 21: 621-641.

Kessler R, Berglund P, Demler O, Ji R, Merikangas KR y Walters EE (2005). High occurrence of mood and anxiety disorders among older adults: The National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*, 67: 489-496.

Kida S y Serita T (2014). Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory. *Brain Research Bulletin*, 105: 17-24.

Koen N y Stein DJ (2011). Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13: 423-437.

Kumar V, Bhat Z.A. y Kumar D (2013). Animal models of anxiety: a comprehensive review. *Journal Pharmacology and Toxicology Methods*, 68: 175-183.

Lagraauw, Kuiper & Bot (2015). Acute and chronic psychological stress as risk factors for cardiovascular disease: Insights gained from epidemiological, clinical and experimental studies. *Brain, Behavior, and Immunity*, 50: 18-30.

Leal-Galicia P, Saldívar-González JA, Sumiko-Morimoto S, Arias C (2006). Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: role of individual responsiveness to anxiety. *Journal of Neurobiology*, 395-405.

Lebron-Milan K y Milad MR (2012). Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. *Biology of Mood and Anxiety Disorders*, 2: 3-15.

Li S, Murakami Y, Wang M, Maeda K y Matsumoto (2006). The effects of chronic valproate and diazepam in a mouse model of posttraumatic stress disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85: 324-331.

Luscher B, Shen Q y Sahir N (2011). The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*, 16:383-406.

Mancuso CE, Tanzi MG, y Gabay M (2004). Paradoxical reactions to benzodiazepines: literature review and treatment options. *Pharmacotherapy*, 24(9): 1177-1185.

Marcussen AB, Flagstad P, Kristjansen PE, Johansen FF y Englund U (2008). Increase in neurogenesis and behavioral benefit after chronic fluoxetine treatment in Wistar rats. *Acta Neurologica Scandinavica*, 117 (2): 94-100.

McEwen BS (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*, 886: 172-189.

McKlveen JM, Wyers B, Flak JN, Bundzikova J, Solomon MB, Seroogy, KB y Herman JP (2013). Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion. *Biological Psychiatry*, 64: 672-679.

Medeiros LR, Cartolano MC y McDonald MD (2014). Crowding stress inhibits serotonin 1A receptor-mediated increases in corticotropin-releasing factor mRNA expression and adrenocorticotropin. *Journal of Comparative Physiology*, 184: 259-271.

Medina-Martel M, Urbina M, Fazzino F y Lima L (2013). Serotonin transporter in lymphocytes of rats exposed to physical restraint stress. *Neuroimmunomodulation*, 20: 361-367.

Nade VS, Kawale L, Nak RA y Yadav AV (2009). Adaptogenic effect of *Morus alba* on chronic footshock-induced stress in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 41: 246-251.

Navarrete F y Camarillo GL (2013). Estado actual del tratamiento de la ansiedad. *Medicine*: 11(46): 2747-2754.

Nephew BC, Aaron RS y Romero MI (2005). Effects of arginine vasotocin (AVT) on the behavioral, cardiovascular, and corticosterone responses of starlings (*Sturnus vulgaris*) to crowding. *Hormones & Behavior*, 47: 280-289.

Nestler EJ, Barot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ y Monteggia LM (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, 34: 13-25.

Nobre MJ (2013). Changes on auditory physiology in response to the inactivation of amygdale nuclei in high anxiety rats expressing learned fear. *Physiology & Behavior*, 118: 80-87.

Oliver B (2014). Serotonin: a never-ending story. *European Journal Pharmacology*, 14: 2999-3006.

Panhelainen A y Korpi E (2012). Evidence for a role of inhibition of orexinergic neurons in the anxiolytic and sedative effects of diazepam: A c-Fos study. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 101: 115-124.

Pawlak D, Takada Y, Urano T y Takada A (2000). Serotonergic and kynurenic pathways in rats exposed to foot shock. *Brain Research Bulletin*, 52: 197-205.

Phatak NL, Kasture SB, Bhatt NM y Patel RG (2011). Experimental Modeling of Anxiety. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01: 06-10.

Pickles A, Hagan J, Jones D y Hendrie C (2012). Short-term individual housing induced social deficits in female Mongolian gerbils: attenuation by chronic but not acute imipramine. *Neuropharmacology*, DOI 10.1016/j.neuropharm.2011.12.016.

Pinacho-García LM (2010). *Respuestas emocionales atípicas en el modelo Treit y el efecto de la administración de diazepam y flumazenil en estas*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Pinacho-García LM y Saldivar-González JA (2009). Efecto paradójico de diazepam en el modelo de conducta defensiva de enterramiento en la rata: acción de flumazenilo. *AMEFAR*, 20099: 32-34.

Ping G, Qian W, Song G y Zhaochun S (2014). Valsartan reverses depressive/anxiety-like behavior and induces hippocampal neurogenesis and expression of BDNF protein in unpredictable chronic mild stress mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124: 5-12.

Quidé Y, Witteveen A, El-Hage W, Veltman D J y Olf M (2012). Differences between effects of psychological versus pharmacological treatments on functional and morphological brain alterations in anxiety disorders and major depressive disorder: a systematic review. *Neuroscience Biobehavior*, 36: 626-644.

Ramos A (2008). Animal models of anxiety: do I need a multiple tests? *Trends Pharmacology Science*, 10: 493-498.

Ravindran IN, Stein MB (2010). The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. *Journal Clinical Psychiatry*, 71: 839-854.

Ravindran R, Rathinaswamy SD, Samson J y Senthilvelan M (2005). Noise-stress-induced brain neurotransmitter changes and the effect of *Ocimum sanctum* (Linn) treatment in albino rats. *Journal Pharmacology Science*, 98:354-360.

Raz S y Berger B (2010). Effects of fluoxetine and PCPA on isolation-induced morphine self-administration and startle reactivity. *Pharmacology Biochemical Behavior*, 96: 56-66.

Richards D, Richardson T, Timulak L y McElvaney J (2015). The efficacy of internet-delivered treatment for generalized anxiety disorder: A systematic review and meta-analysis. *Internet Interventions*, 2: 272-282.

Rodriguez-Landa JF, García-Ríos RI, Cueto-Escobedo J, Bernal-Morales B y Contreras CM (2013). Participation of GABAA chloride channels in the anxiolytic-like effects of a fatty acid mixture. *BioMed Research International*, ID 121794.

Roth T, Zoladz P, Sweatt D y Diamond D (2011). Epigenetic modification of hippocampal *Bdnf* DNA in adult rats in an model of post-traumatic stress disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 45: 919-926.

Rubin MA (2015). Mutismo Selectivo Infantil- Qué es y tratamiento. Recuperado de: <http://lifeder.com/mutismo-selectivo/>

Rudolph U y Knoflach F (2011). Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA (A) receptor subtypes. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10:685-697.

Saldívar-González, JA., Fiesco-Roa, MO., Campos Rodríguez, UE. (2006). Paradoxical response in the elevated plus maze model in rats: effect of diazepam administration. *Western Pharmacology Society*, 16-20.

Saldívar-González JA, Gutiérrez-Aguilar J (2010). Effect of imipramine and diazepam on defensive burying in rats submitted to chronic stress and single low foot shock. *Western Pharmacology Society*, 7-10.

Saldívar-González JA, Posadas-Andrews A, Rojas JA, Yoldi-Negrete M, Álvarez-Sekely A, Flores-Hernández V, Ortiz-León S, Foilloux-Morales C, Mayagoitia L y

Mondragón-Ceballos R (2007). Effect of imipramine and electro convulsive stimulation in mice under social stress conditions. *Current Topics in Pharmacology*, 11(1): 57-70.

Saldivar-Gonzalez JA, Rojas JA, Ramirez-Miranda C, Ortiz-León S, Foilloux-Morales C, Álvarez-Sekely M, Flores-Hernández V, Mayagoitia L y Mondragon-Ceballos R (2008). Effect of administration of imipramine hydrochloride on the forced swimming, defensive burying and open field test in mice submitted to social stress. *Current Topics in Pharmacology*, 12, 758-782.

Salome N, Salchner P, Viltart O, Sequeira H, Wigger A, Landgraf R y Singewald N (2004). Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biological Psychiatry*, 55: 715-723.

Sardinha A, Nardi AE y Zin WA (2009). Are panic attacks really harmless? The cardiovascular impact of panic disorder. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 31: 57-62.

Shekhar A, McCann UD y Meaney MJ (2001). Summary of National Institute of Mental Health workshop: developing animal models of anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl)*, 157: 327-339.

Singewald N (2007). Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31: 18-40.

Sladana D, Nataša S, Ljubica G y Varagić V (2007). Behavioural and endocrine responses of socially isolated rats to long-term diazepam treatment. *Acta Veterinaria*, 57: 291-302.

Slezak P, Puzserova A, Balis P, Sestakova N, Majzunova M, Dovinova I, Kluknavsky M, Bernatova I (2014). Genotype-related effect of crowding stress on blood pressure and vascular function in young female rats. *Biomed Research International*, DOI: 10.1155/2014/413629.

Souza da Silva LF, Coimbra NC y Menescal-de-Oliveira L (2013). Rostral ventromedial medulla connections in *Cavia porcellus* and their relation with tonic immobility defensive behavior: A biotinylated dextran amine neurotracing study. *Neuroscience Letters*, 535: 116-121.

Spasojevic N, Jovanovic P y Dronjak S (2015). Differential regulation of catecholamine synthesis and transport in rat adrenal medulla by fluoxetine treatment. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87: 343-350.

Steimer T (2011). Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues in Clinic Neuroscience*, 13: 495-508.

Treit D (1985). Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 9: 203-222.

Treit D, Pinel JP y Fibiger HC (1981). Conditioned defensive buryin: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 15: 619-626.

Vaessen T, Hernaus D, Myin-Germeys I y Amelsvoort TV (2015). The dopaminergic response to acute stress in health and psychopathology: A systematic review. *Neuroscience y Behavioral Reviews*, 56: 241-251.

Valentino R y Van Bockstaele E (2014). Endogenous opioids: The downside of opposing stress. *Neurobiology*, ID 10.1016/j.ynstr.2014.09.006

Van tol MJ, Van Der Wee NJ, Van den Heuvel OA, Nielen MM, Demenescu LR, Aleman A, Renken R, Van Buchem MA, Zitman, FG y Veltman DJ, 2010. Regional brain volume in depression and anxiety disorders. *Archives of General Psychiatry*, 67: 1002-1011.

Vermeiden M, Mulder PG, Van Den Broek WW, Bruijn JA, Birkenhäger TK, (2013). A double-blind randomized study comparing plasma level-targeted dose imipramine and high-dose venlafaxine in depressed inpatients. *Journal of Psychiatric Research*, 47: 1337-1342.

Violle N, Balandras F, Le Roux Y, Desor D y Schroeder H (2009). Variations in illumination, closed Wall transparency and/or extramaze space influence both baselne anxiety and response to diazepam in the rat elevated plus maze. *Behavior and Brain Research*, 203: 35-42.

Warner-Schmidt J. y Duman R (2006). Hippocampal Neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*, 16: 239-249.

Whishaw I y Kolb B (2005). *The behavior of the laboratory rats: A handbook with test*. New York: Oxford University Press.

Zannas AS y West AE (2014). Epigenetics and the regulation of stress vulnerability and resilience. *Neuroscience*, 264: 157-170.

Zhang X, Zhong Y, Wang W y Ru S (2015). Impairment of cortisol stress response mediated by hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to monocrotophos pesticide. *Comparative and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 176-177: 10-16.

Zienowicz M, Wisłowska-Stanek A, Lehner M, Taracha E, Skórzewska A, Bidziński A, Turzyńska D, Sobolewska A, Walkowiak J, Maciejak P, Szyndler J y Plaźnik A (2007). Fluoxetine attenuates the effects of pentylentetrazol on rat freezing behavior and c-Fos expression in the dorsomedial periaqueductal gray. *Neuroscience Letters*, 414: 252-256.