

## **Alternativa técnico-metodológica para la inducción de estrés en animales de experimentación. Evaluación como posible modelo de depresión en dos versiones del Test de Natación Forzada**

**Resumen.** En este trabajo se evaluaron los efectos pro-depresivos de la exposición a un estresor de manera repetida e inescapable: una adaptación del Laberinto Elevado en Cruz, en dos versiones del Test de Natación Forzada (TNF), un test de depresión para animales de experimentación. Los resultados indican que el tratamiento no constituye un estresor susceptible de ser utilizado para la inducción de patrones comportamentales asociados a la depresión. Además se obtuvo evidencia de que las dimensiones de la pileta utilizada en el TNF constituyen un factor relevante a la hora de evaluar distintos patrones comportamentales. Finalmente, se encontró que uno de los tratamientos utilizados para la inducción de niveles bajos de estrés indujo un efecto inesperado tipo antidepressivo en el TNF. El posible mecanismo que subyace a este resultado es discutido en el trabajo.

**Abstract.** In this research, the pro-depressant effects of the exposure to a repeated and unescapable stressor (an adaptation of the Plus Maze) were evaluated in two versions of the Forced Swimming Test, a depression test for experimental animals. The results show that the treatment is not a stressor suitable to induce behavioral patterns associated to depression. Also, evidence was obtained that indicate that the dimensions of the Forced Swimming Test tank are an important factor to evaluate different behavioral patterns. Finally, an unexpected antidepressant effect was found with a treatment to induce low stress levels. The possible mechanisms that underlie this results are discussed.

### **Introducción**

Los trastornos del estado de ánimo, y entre ellos los trastornos depresivos (APA, 1994), constituyen un serio problema a nivel epidemiológico en el mundo occidental. Ha sido estimado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que para el año 2020, estos ocuparán el segundo lugar de prevalencia a nivel mundial entre las enfermedades humanas causantes de algún tipo de discapacidad (Murray & Lopez, 1997).

El estado actual de conocimiento en términos de etiología, fisiopatología, tratamiento y marcadores biológicos de trastornos del estado de ánimo está lejos de ser satisfactorio. Baste con considerar que no es posible arribar a un diagnóstico confiable mas allá de la entrevista psiquiátrica y el uso de test psicométricos, como tampoco se puede predecir si un paciente se beneficiará de una terapia en particular (Matthews, Christmas, Swan & Sorrell, 2005; Anisman, Merali & Otead, 2008). Se trata entonces de una patología de alta prevalencia, difícil de diagnosticar y tratar, que además

**Ferrer Monti, Roque Ignacio<sup>1</sup>; Bueno, Adrián Marcelo<sup>1</sup>, y Argibay, Pablo Francisco<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Facultad de Psicología, UNC.

<sup>2</sup>Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de la Ciudad de Buenos Aires.

**Grupo de investigación al que pertenece el trabajo:**

Colaboración entre miembros del Laboratorio de Psicobiología Experimental, Facultad de Psicología, UNC y el Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina

**Palabras claves:**

Depresión, Antidepressivos, Estrés, Modelos animales, Psicopatología, Psicobiología experimental

**Keywords:**

Depression, Antidepressants, Stress, Animal models, Psychopathology, Experimental psychobiology

**Enviar correspondencia a:** Roque Ignacio Ferrer Monti

E-mail: [rferrer@psyche.unc.edu.ar](mailto:rferrer@psyche.unc.edu.ar)

conlleva severos riesgos para quien la padece: los intentos de suicidio tienen la mayor probabilidad de ocurrencia durante los tres primeros meses de iniciado un episodio depresivo mayor (Sher, Oquendo & Mann, 2001).

### **El uso de modelos animales en la investigación sobre depresión.**

Un tipo de abordaje posible y útil para la investigación de este tipo de patologías es el uso de modelos animales. Las razones básicas que justifican su uso se relacionan con aspectos éticos y limitaciones metodológicas propias de los estudios clínicos (control sistemático de variables experimentales, antecedentes genéticos, etc.) (Richardson, 1990; Kalueff, Wheaton & Murphy, 2007). Sin estos modelos, se vería seriamente limitada la investigación neurocomportamental y farmacológica sobre la depresión. Sin embargo, ningún modelo animal puede reflejar el amplio rango de síntomas de los trastornos depresivos, una limitación que es importante recordar para no confundir el alcance de los mismos (Guimãraes, Joca, Padovan & Molina, 2006). A pesar de ello se puede afirmar que actualmente los modelos animales son la mejor alternativa para aproximarse experimentalmente a estos trastornos.

El hecho de que la depresión sea un trastorno de etiología compleja exige una multiplicidad de modelos para su estudio. No es objetivo de este trabajo analizar en detalle cada uno de ellos (para excelentes revisiones, Kalueff et al, 2007; Nestler, Gould & Manji, 2002). Pero la mayoría de los modelos animales de depresión tienen como punto común el uso de estresores ambientales como estrategia para la inducir la expresión de los cambios neuroquímicos, fisiológicos y comportamentales asociados a esta patología. Esto debido a que el estrés ha sido consistentemente reportado como un factor crítico en la vulnerabilidad, desarrollo y mantenimiento de los trastornos del estado de ánimo (Guimarães et al, 2006; Anisman, Merali & Stead, 2008; Brenes, Rodríguez & Fornaguera, 2008; McKay & Zakzanis, 2009).

### **El test de natación forzada.**

Un modelo de esta categoría, ampliamente utilizado, es el Test de Natación Forzada (TNF). Fue propuesto originalmente por Porsolt, Antón, Blavet & Jalfre en 1978. Validado tanto en ratas como en ratones (Cryan, Valentino & Lucki, 2005a), se basa en el repertorio comportamental de los roedores para la detección de drogas antidepresivas (Lino-de-Oliveira, De Lima & Carobrez, 2005). El procedimiento estándar del TNF consiste en someter a los animales de experimentación dos veces a un tanque de agua inescapable (el animal debe, forzosamente, nadar para no ahogarse). El intervalo entre ensayos es de 24 hs., siendo el primero (pre-test) de 15 minutos y el segundo (test propiamente) de 5 minutos. Durante los primeros minutos del pre-test, los animales realizan conductas vigorosas, consideradas “activas”: climbing o escalada (movimientos verticales dirigidos hacia la única salida del aparato, con los cuartos delanteros apoyados contra las paredes del mismo), swimming o natación

(movimientos circulares sobre la superficie del agua) y diving o buceo (movimientos de exploración del fondo del tanque, con todo el cuerpo sumergido bajo la superficie del agua); eventualmente, este tipo de conductas se vuelve menos frecuente y da lugar a una conducta considerada “pasiva”: floating o inmovilidad (pequeños movimientos, necesarios únicamente para mantener la cabeza fuera del agua) (Lino-de-Oliveira et al, 2005).

Prácticamente todos los tratamientos farmacológicos antidepresivos de eficacia clínica en humanos (además de la terapia electro convulsiva y privación de etapas de sueño MOR) revierten este patrón, sin afectar la motricidad a idénticas dosis en otras pruebas comportamentales, como el Test de Campo Abierto, estrategia utilizada para descartar falsos positivos propios de psicoestimulantes no eficaces como antidepresivos (por ejemplo, anfetaminas y cocaína) (Porsolt et al, 1978). Finalmente, este test es uno de los pocos que permite diferenciar, a través de patrones comportamentales, el sistema de neurotransmisión afectado farmacológicamente. Aquellos compuestos que aumentan la disposición de 5HT (serotonina) en el espacio sináptico, aumentan los parámetros de natación, mientras que los que hacen lo mismo con la NA (noradrenalina) aumentan los parámetros de escalada (informado originalmente por Detke, Rickels & Lucki, 1995).

### **Desventajas del TNF como inductor de estrés**

Sin embargo, algunos reportes en la literatura desaconsejan el uso del procedimiento estándar del TNF. De Pablo, Parra, Segovia y Guillamón (1988) demostraron que los efectos pro-depresivos del pre-test podían ser revertidos mediante el uso de anisomicina, un inhibidor de síntesis de proteínas usualmente utilizado como amnésico. Esto sugirió que durante el test en realidad no se está evaluando netamente un estado asociado a la depresión, si no también un aprendizaje previo (realizado durante el pre-test; probablemente que la inmovilidad es la mejor estrategia de la cual dispone el animal para no ahogarse y ahorrar energía) y que incluso los tratamientos antidepresivos, en este modelo, logran parte de su efecto dificultando la consolidación de memorias asociadas al pre-test (Guimarães et al, 2006). Esto no invalida al TNF para evaluar procedimientos pro y anti depresivos, ya que ha sido reportado en años recientes que se puede evaluar varias drogas con distinta farmacodinámica en un solo ensayo de 15 minutos, a fin de evitar efectos previos de aprendizaje del pre-test (Cryan, Page & Lucki, 2005b).

### **Alternativa para la inducción de estrés y su evaluación en el TNF.**

Bajo las premisas comentadas anteriormente, se deben considerar otras opciones al pre-test del TNF. Este trabajo pretende contribuir al campo de los modelos animales de depresión proponiendo y evaluando en el TNF un procedimiento de inducción de estrés que sea pro-depresivo. Se trata la exposición forzada, crónica e inescapable a un espacio reducido de altura. El aparato construido a tal

fin se diseñó a partir de un test estándar para medir ansiedad en roedores, el Laberinto Elevado en Cruz (LEC), originalmente propuesto por Pellow, Chopin, File & Briley (1985).

El LEC consiste en una plataforma elevada sobre el suelo, usualmente de 50 cm. o más, compuesta por cuatro brazos. Dos de ellos están protegidos por paredes, y los dos restantes no. Cuenta con una zona central, desde la cual el sujeto experimental puede acceder a cualquiera de los cuatro brazos. Usualmente se utilizan 5 minutos de exposición al aparato. Los roedores presentan un patrón comportamental específico ante esta situación: prefieren los brazos cerrados y la zona central a los brazos abiertos. Esto se evidencia por la cantidad de entradas, duración de las mismas y tiempo total de permanencia en los brazos cerrados, mayor que en el caso de los brazos abiertos (Carobrez & Bertoglio, 2005). Actualmente, el LEC constituye el test de ansiedad más utilizado en roedores, habiendo sido validado para drogas ansiogénicas y ansiolíticas, las cuales aumentan y disminuyen respectivamente los índices mencionados anteriormente (Pellow et al, 1985; Wall & Messier, 2001; Carobrez & Bertoglio, 2005).

Los factores que determinan este patrón comportamental son tema de discusión actualmente, y se han propuesto varios posibles, entre ellos la aversión natural de los roedores a la altura y los espacios abiertos (Lister, 1990), la preferencia hacia la proximidad de espacios verticales que permiten protección y contacto con los bigotes (Dyck, 2005), la recolección de información mediante claves visuales distantes (Cardenas, Lamprea & Morato, 2001) y el contraste generado entre las características aversivas de los brazos abiertos y la relativa “seguridad” de los brazos cerrados (Carobrez y Bertoglio, 2005).

La naturaleza aversiva de los brazos abiertos ha sido también demostrada mediante otros índices: la exposición forzada a un brazo abierto (mediante el bloqueo de la zona central) aumenta la defecación y los niveles de corticosteroides plasmáticos, en comparación con la exposición forzada al brazo cerrado y a un grupo control (Pellow et al, 1985; Rodgers, Haller, Halasz & Brain, 1999). Incluso la exposición repetida a este brazo no produce habituación de la respuesta de corticosterona plasmática (Rodgers et al, 1999).

La exposición al brazo abierto parece ser, por lo tanto, un estresor útil para ser administrado de manera repetida. Además fácilmente puede convertirse en un espacio inescapable y permite un alto grado de estandarización, por la simplicidad del aparato utilizado. El tipo de estrés que genera se basa en la exposición a estímulos etológicamente relevantes para inducir ansiedad y no induce daño físico al animal ni compromete su motricidad al momento de evaluar sus efectos. Al ser un aparato distinto al utilizado para evaluar sus efectos pro-depresivos se evitan efectos previos de aprendizaje al momento del test que confundan los resultados. Estas razones explican la elección de esta alternativa técnica.

### **Adaptación del LEC.**

En una serie de trabajos piloto, hemos observado inconvenientes que desaconsejan el uso del LEC con la entrada a la zona central bloqueada, como en los trabajos de Rodgers et al (1999) y Pellow et al (1985). Mientras se utilizaba de esa manera el LEC, se observó que varios animales introducían la cabeza entre el ángulo formado por el brazo abierto y el brazo cerrado, impidiendo o evitando (a nuestro juicio) una exposición sostenida a las claves aversivas del aparato.

Para solucionar este problema, se construyó una réplica de un brazo cerrado del LEC, con las siguientes dimensiones: 50cm. de altura, 45cm. de ancho y 15cm. de profundidad. Se utilizó acrílico negro, material fácil de limpiar para evitar claves orosensoriales que puedan afectar el comportamiento de los sujetos. Todas las tapas del aparato son cerradas, a excepción de una. De esta forma, el aparato puede ser utilizado de dos formas maneras. La primera, como el brazo cerrado del LEC. Esta primera modalidad recibe el nombre de Plataforma Cerrada (PC). Invirtiendo la posición del aparato, se obtiene la otra forma de utilización: como el brazo abierto del LEC. Esta segunda modalidad recibe el nombre Plataforma Elevada (PE).

En la configuración PC los animales estarían *dentro* del aparato. En la configuración PE los animales estarían *sobre* el aparato. Es importante notar esta diferencia (PC = animal dentro y PA= animal sobre el aparato), pues en ella se basa la solución a los inconvenientes mencionados. En la configuración PE los animales están expuestos a todas las condiciones aversivas del brazo abierto del LEC: espacio abierto, altura y falta de superficies verticales que permitan algún tipo de protección. Se suma también la imposibilidad de escapar del aparato y el espacio reducido. En la configuración PC los animales están expuestos a distintas condiciones, menos aversivas: el espacio no es abierto, no hay altura, hay superficies verticales que permitirían protección. Al igual que la configuración PE el espacio es reducido e inescapable. De esta forma, con un diseño de tres grupos se podría inducir niveles diferenciales de estrés en función de la configuración: PE (estrés elevado), PC (estrés medio) y un grupo control (estrés basal). Cabe destacar que un diseño de este tipo no constituye un diseño triádico (como en los modelos de indefensión aprendida), si no simplemente un diseño de estrés inescapable de dos niveles (elevado y medio) y un grupo control

Un aparato y procedimiento similar en ciertos aspectos al aquí propuesto fue presentado por Ennaceur, Michalikova & Chazot (2006). Los autores utilizaron un Campo Abierto, aparato de uso común en neurociencia, originalmente propuesto por Hall (1934) para investigar aspectos emocionales en roedores. Básicamente los autores usaron el criterio de doble configuración, como el aquí propuesto: un mismo aparato que invirtiendo su posición puede funcionar tanto como un espacio cerrado o como un espacio abierto de altura. La diferencia entre el presentado por Ennaceur et al (2006) y el aquí propuesto es de tamaño (80 x 80 x 50 cm., en el primer caso y 50 x 45 x 15 cm. en el segundo). Ennaceur y sus colaboradores obtuvieron resultados que apoyarían la propuesta aquí

presentada: mediante índices múltiples de comportamiento exploratorio y ansiedad, se demostró que el espacio abierto y elevado resultaba más aversivo que el espacio cerrado (Ennaceur et al, 2006).

En nuestro trabajo, solo se utilizó un ensayo de evaluación de 15 minutos en el TNF a fin de evitar efectos de exposición repetida al tanque (Cryan et al, 2005; de Pablo et al, 1988). A su vez, estudiamos las propiedades pro-depresivas en dos versiones del TNF, en función del diámetro del mismo. La inclusión de este factor en el diseño, a fin de controlarlo, se debe a que ha sido demostrado que determina diferencialmente comportamientos y respuestas hormonales y metabólicas en los animales de experimentación (Calil & Marcondes, 2006).

El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades pro-depresivas de la exposición repetida e inescapable a una Plataforma Elevada, en comparación con el mismo tipo de exposición a una Plataforma Cerrada y un grupo control, a fin de determinar su utilidad como posible herramienta de investigación en modelos animales de depresión.

### **Materiales y métodos.**

*Sujetos:* En el presente estudio se utilizaron 42 ratas macho, cepa Wistar, de 2 meses de edad. Estos sujetos fueron criados en el Bioterio de Animales Pequeños del Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME) del Hospital Italiano de Buenos Aires. Los sujetos se mantuvieron alojados en cajas estándar (modelo 1354G, Tecniplast), agrupados de a 3-4 sujetos por jaula bajo condiciones de humedad y temperatura (19-22° C) controladas, con un ciclo de luz / oscuridad de 12 hs. (la luz se prendía a las 8 a.m.). Para todos los animales la provisión de comida y agua fue *ad libitum*.

*Aparatos:* se utilizaron 3 aparatos experimentales. El primero consiste en una caja deacrílico color negro cuyas dimensiones son 50 x 45 x 15 cm., con 5 lados cerrados y un lado abierto. El segundo y tercer aparato consisten en piletas de acrílico transparente (50 cm. x 20 cm. y 50 x 40 cm., respectivamente), con un nivel de profundidad de agua de 30 cm. para ambas, a  $25 \pm 1$  C ° de temperatura.

*Procedimientos:* Siete días antes del comienzo de los experimentos todos los animales fueron identificados, pesados y habituados al contacto con el experimentador (manipulación de los animales durante 5 minutos diarios), antes de su traslado a una sala separada del bioterio. Los 42 animales fueron asignados aleatoriamente a uno de tres grupos, y los tres grupos así conformados (n = 14 cada uno) fueron asignados también aleatoriamente a una de las 3 condiciones experimentales definidas por el tratamiento de exposición al estresor. Los grupos así conformados reciben los siguientes nombres:

- Grupo Control (C): En este grupo, los animales fueron expuestos una hora diaria a la sala experimental, durante 4 días consecutivos.

▪ Grupo Plataforma Elevada (PE): Los sujetos de este grupo tuvieron una exposición diaria de 45 minutos en la sala experimental, seguida de 15 minutos en el aparato, modalidad PE, durante 4 días consecutivos.

▪ Grupo Plataforma Cerrada: (GPC): Los sujetos de esta condición experimental fueron colocados diariamente durante 45 minutos en la sala experimental, y posteriormente durante 15 minutos en el aparato, modalidad PC, durante 4 días consecutivos.

Veinticuatro horas después del último día de exposición todos los sujetos fueron evaluados en el Test de Natación Forzada durante 15 minutos. Los experimentos fueron realizados en una sala aislada de sonidos, con temperatura controlada a 19-22° C, iluminada por dos focos de 75 W, entre las 9 y las 15 horas. La mitad de los animales de cada grupo fue sometido al Test de Natación Forzada de 20 cm. de diámetro, mientras que la otra mitad fue sometida al de 40 cm. de diámetro, a fin de obtener resultados en ambas versiones y poder comparar la sensibilidad de cada uno a estos procedimientos.

Todos los Test de Natación Forzada fueron filmados por una cámara digital, ubicada a 2 metros del tanque en sentido horizontal. La cámara estaba conectada a una computadora en una sala contigua a la experimental, y se almacenaron los videos para su posterior análisis. El análisis de los videos se realizó mediante el software EthoLog, v. 2.25 por un observador “ciego” a los tratamientos. Las conductas a medir fueron: 1) inmovilidad o “floating”: movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua; 2) escalada o “climbing”: movimientos vigorosos con sus extremidades delanteras fuera de la superficie del agua y contra los límites del cilindro; 3) nado o “swimming”: movimientos de traslado dentro del aparato, con las extremidades delanteras bajo la superficie del agua; y 4) buceo o “diving”: inversión de la postura corporal en sentido vertical, con todo el cuerpo bajo la superficie del agua. De cada conducta se cronometró su duración total. Estas conductas constituyen el estándar de evaluación en el Test de Natación Forzada, ya que son sensibles a diversos procedimientos, entre ellos estrés previo y fármacos antidepresivos de efectividad clínica en humanos (Matthews et al, 2005; Sun & Alkon, 2003).

Para realizar una estimación del grado de estrés inducido por las dos configuraciones posibles (PC y PE), se tomaron medidas de emisión de bolos fecales poro día de ensayo (durante la exposición al aparato). Si bien no es una medición muy confiable sigue siendo utilizada en la actualidad (Ennaceur et al, 2006), y es de bajo costo en comparación con otras medidas fisiológicas como los niveles de corticosteroides plasmáticos.

Por último hay que indicar que dos animales (uno perteneciente al grupo PE y otro al grupo C) fueron retirados del experimento, ya que se detectaron signos de enfermedad respiratoria. Quedaron un n = 6 para el grupo PE, un n = 6 para el grupo C y un n = 7 para el grupo PC que fueron evaluados en la versión chica del TNF.

*Diseño y análisis estadístico:* El diseño del experimento es un diseño factorial que incluye los siguientes factores: 3 (condiciones de tratamiento de exposición) x 2 (condiciones de evaluación). Para

el análisis inferencial se utilizó ANOVA factorial y ANOVA de medidas repetidas. El Test de Tukey fue utilizado como prueba post hoc frente a diferencias significativas reportadas por el ANOVA. El nivel de significación estadística para todos los análisis se propuso en  $\alpha = 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron en el software Statistica, v. 7.0

## **Resultados**

### *Emisión de bolos fecales durante la fase de exposición al aparato:*

El ANOVA de medidas repetidas (condición de exposición x días de ensayo) señaló un efecto significativo de condición de exposición [F (1,25) = 23,065;  $p < 0,05$ ], un efecto significativo de días de ensayo [F (3,75) = 12,13;  $p < 0,05$ ] y una interacción significativa de condición de exposición x días de ensayo [F (3,75) = 7,10;  $p < 0,05$ ]. Para analizar la causa de esta interacción se realizaron ANOVAs de una vía (condición de exposición como factor) para la puntuación obtenida cada día de exposición. Estos análisis encontraron una mayor cantidad de bolos fecales en el grupo PE que en el PC el primer [F (1,25) = 32,996;  $p < 0,05$ ], el segundo [F (1,25) = 10,396;  $p < 0,05$ ] y el cuarto [F (1,25) = 10,368;  $p < 0,05$ ] día de exposición, pero no así el tercer día [F (1,25) = 0,388;  $p > 0,05$ ]. También se realizaron dos ANOVAs de medidas repetidas (día como factor) con las puntuaciones de cada uno de los grupos de exposición por separado. Para el grupo PE se encontró un efecto significativo de día de ensayo [F (3,36) = 10,497;  $p < 0,05$ ], mientras que para el grupo PC no hubo efectos significativos de día de ensayo [F (3,36) = 1,368;  $p > 0,05$ ].

El análisis post hoc para el grupo PE reveló que el primer día los animales emitieron significativamente más bolos que en todos los restantes, menos el cuarto. A su vez, el segundo día emitieron significativamente menos que el primero, aunque no hubo diferencias con el tercero (Ver Figura 1). En resumen, considerando la mayor cantidad de bolos fecales como un indicador de estrés, se puede concluir que el procedimiento empleado en la condición PE indujo un mayor nivel de estrés que el empleado en la condición PC, un efecto que se observó todos los días de la fase de preexposición exceptuando el tercero.

### *Patrones comportamentales durante la exposición al Test de Natación Forzada:*

*Escalada:* hubo efecto significativo de versión del TNF [F (1,34) = 9,587;  $p < 0,05$ ], ningún efecto de condición de preexposición [F (2,34) = 0,424;  $p > 0,05$ ] y no hubo interacción significativa de condición de preexposición x versión del TNF [F (2,34) = 0,160;  $p > 0,05$ ]. Ver figura 2. Los sujetos evaluados en el TNF chico estuvieron más tiempo haciendo esta conducta que los evaluados en el TNF grande.

*Natación:* el ANOVA indicó un efecto significativo de versión del TNF [F (1,34) = 140,73;  $p < 0,05$ ], pero no se encontró ni efecto condición de preexposición [F (2,34) = 0,558;  $p > 0,05$ ] ni interacción significativa condición de preexposición x versión del TNF [F (2,34) = 0,053;  $p > 0,05$ ]. Ver

figura 3. En la versión grande del TNF los sujetos estuvieron más tiempo nadando que en la versión chica.

*Buceo:* el ANOVA encontró un efecto significativo de versión del TNF [ $F(1,34) = 11,61$ ;  $p < 0,05$ ], un efecto significativo condición de preexposición [ $F(2,34) = 9,142$ ;  $p < 0,05$ ] aunque no hubo interacción significativa de condición de preexposición x versión del TNF [ $F(2,34) = 0,053$ ;  $p > 0,05$ ]. El análisis post hoc reveló que el grupo PC estuvo más tiempo realizando esta conducta que los dos restantes grupos, que no difirieron entre sí. Además en el TNF chico los sujetos estuvieron más tiempo buceando que en el TNF grande. Ver figura 4.

*Inmovilidad:* el ANOVA encontró un efecto significativo de versión del TNF [ $F(1,34) = 153,91$ ;  $p < 0,05$ ], pero no de la condición de preexposición [ $F(2,34) = 0,179$ ;  $p > 0,05$ ] y tampoco interacción significativa de condición x versión del TNF [ $F(2,34) = 0,471$ ;  $p > 0,05$ ]. Como se puede ver en la figura 5, esta conducta estuvo presente más tiempo en el TNF chico que en el grande.

## Discusión

En el presente estudio se propuso analizar si la experiencia en una plataforma elevada puede ser utilizada como un procedimiento inductor de estrés. De acuerdo a nuestra hipótesis la experiencia en la plataforma elevada iba a ser suficiente para alterar el patrón de conducta de las ratas en el TNF, test ampliamente utilizado para detectar estados de tipo depresivos en roedores. El número de bolos fecales en la plataforma elevada parece indicar que la exposición a la misma genera un estado de estrés mayor que la experiencia en la condición PC. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en las principales variables dependientes del TNF, un resultado que no apoya la hipótesis de trabajo del presente estudio.

Claramente, la modalidad PC no indujo alto estrés, al menos si consideramos el número de bolos fecales como indicador operacional. Los valores para este grupo nunca superaron la unidad por día de ensayo. Al comparar los resultados de este grupo con PE, exceptuando el tercer día de exposición, siempre fue más estresante PE que PC. Sin embargo, no escapa a la observación el hecho de que la curva de emisión de bolos fecales para PE indica una clara disminución hasta el tercer día, lo cual podría indicar la ocurrencia de habituación a la condición experimental. Esto, evidentemente, podría haber interferido con los objetivos del estudio. Sin embargo, al cuarto día la emisión de bolos en la condición PE recupera el valor del primer día. Para poder responder estos interrogantes, debería hacerse otro tipo de análisis complementarios (por ejemplo, niveles de corticosterona en plasma) lo cual no fue posible por el alto costo de un kit de ELISA, una de las técnicas que permiten la determinación de los niveles de estas hormonas. La literatura (Rodgers et al, 1990) indica que no hay habituación a estas condiciones, al menos en términos neuroendócrinos.

En ambas versiones del TNF, el grupo PE no mostró ninguna evidencia de un estado asociado a la depresión. De hecho, los valores para este grupo fueron iguales que los valores control y PC. Si es

cierto que lo observado en la curva de emisión de bolos fecales es un efecto de habituación, entonces la condición PE fue progresivamente menos estresante, un fenómeno que puede representar un inconveniente en cualquier modelo animal de depresión inducido por estrés. También es factible que la modalidad PE haya sido estresante durante los cuatro días de ensayo (no mediando efecto de habituación), pero no lo suficiente como para alterar los parámetros de inmovilidad. Esta posibilidad debería ser abordada en estudios futuros. Una alternativa que podría ayudar a mejorar el diseño sería alterar algún factor del aparato experimental en cada día de ensayo (por ejemplo, utilizar un día un piso de metal, el segundo día uno grillado de plástico, etc.) para volver impredecibles a las condiciones experimentales, volviendo mas estresante al procedimiento, y dificultando la posible habituación.

Por otro lado, las conductas de escalada y natación no fueron sensibles para encontrar diferencias significativas entre las condiciones de exposición, lo cual apoya la idea de que el diseño y / o aparato experimental no es pro-depresivo, al menos bajo la condición PE. De hecho, en esta última condición de preexposición hubiera sido esperable encontrar una disminución en la expresión de estas conductas si la experiencia en la plataforma hubiera generado un estado asociado a la depresión. En resumen, los datos obtenidos para el grupo PE refutan la hipótesis de este trabajo.

Sin embargo, el grupo PC se comportó de forma inesperada en términos de expresión de la conducta de buceo. Este grupo tuvo un desempeño significativamente mayor que PE y C, a la vez que no difiriendo estos dos grupos entre sí. Este resultado podría indicar la existencia de un efecto antidepressivo producto de la experiencia previa con la condición PC, ya que el buceo en el TNF es un claro patrón de escape. En apoyo a esta posibilidad es relevante considerar que la administración de antidepressivos produce un aumento en la expresión de este comportamiento (Gonzalez & Aston-Jones, 2008; Arunrut, Alejandre, Chen, Cha & Ruso-Neustadt, 2009).

Es necesario intentar una explicación para este resultado sorprendente. Cabe aclarar, antes de tratar esto, que lo que sigue es meramente especulativo, y no puede ser concluido fehacientemente a partir de los datos de este estudio, para lo que haría falta la incorporación de un nuevo experimento. Podríamos hipotetizar que en la modalidad PC los animales disponían de la posibilidad ocupar lugares “protegidos” dentro del aparato. Los extremos de la plataforma estaban cubiertos por tres lados, teniendo los animales lugares más seguros (extremos) que otros (centro de la plataforma), ya que el cuerpo queda mas protegido en una esquina que en el centro. De hecho, este tipo de comportamiento defensivo (esconderse en esquinas menos accesibles) es típico de los roedores (Blanchard & Blanchard, 2005). De esta manera, es factible la elección de un lugar asociado a un menor peligro. En cambio, en la modalidad PE todos los lugares del aparato están igualmente desprotegidos. De esta manera, PE no habría tenido la oportunidad de generar una memoria de la realización de un comportamiento útil para protegerse en un ambiente peligroso. A su vez, el grupo C tampoco podría haber generado este tipo de memoria, puesto no se enfrentó a las condiciones experimentales. Esto

explicaría porque en el TNF PE y C no difirieron entre sí. Pero, nuevamente, esto es solo una hipótesis ad hoc que necesita comprobación experimental.

Finalmente, se observaron diferencias en función de las condiciones de evaluación con el TNF. Si bien este factor no interactuó con los tratamientos de exposición, se demostró claramente que las dimensiones del TNF son una variable a considerar seriamente en términos metodológicos. Debido a que ha sido reportado que fármacos antidepresivos que afectan el sistema serotoninérgico aumentan los parámetros de natación y los que hacen lo mismo con el sistema noradrenérgico aumentan los parámetros de escalada (Detke et al, 1995), sería recomendable, en función de estos resultados, evaluar drogas que afectan al sistema serotoninérgico en aparatos de TNF chicos, ya que dimensiones como la aquí utilizada (20 cm.) arrojan líneas de base muy bajas, permitiendo un mayor grado de sensibilidad y evitando un posible “efecto techo”, mas factible de suceder versiones de mayores dimensiones (40 cm.). Lo mismo, pero en sentido inverso, puede decirse respecto a drogas que afecten el sistema noradrenérgico: los resultados obtenidos en este estudio sugieren utilizar aparatos para el TNF de dimensiones mayores, ya que así se obtienen líneas de base menores para escalada.

En conclusión los resultados del presente estudio refutan nuestra hipótesis de trabajo, ya que la exposición repetida e inescapable a una plataforma elevada no indujo parámetros conductuales asociados a la depresión en el Test de Natación Forzada. Este resultado demuestra que el modelo propuesto, al menos bajo estas condiciones, no es una herramienta útil para la investigación en depresión. Por otro lado, se demostró que el tamaño del aparato usado para el Test de Natación Forzada afecta diferencialmente la conducta de los animales. Finalmente, proponemos que sería de interés estudiar los posibles efectos protectivos de memorias de comportamientos defensivos en situaciones estresantes noveles.

## Referencias

- American Psychiatric Association APA (1994). *Manual diagnóstico y estadístico de los Trastornos mentales. (DSM IV)*, Washington DC: Masson.
- Anisman, H.; Merali, Z. & Stead, J. (2008) Experiential and genetic contributions to depressive and anxiety-like disorders: clinical and experimental studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 32, n. 6, p. 1185-1206.
- Arunrut, T.; Alexandre, H.; Chen, M.; Cha, J. & Russo-Neustadt, A. (2009) Differential behavioral and neurochemical effects of exercise, reboxetine and citalopram with the forced swim test. *Life Sciences*, v. 84, n. 17-18, p. 584-589.
- Blanchard, D. & Blanchard, R. (2005) Antipredator defense. En *The behaviour of the laboratory rat. A handbook with tests*. Wishaw, I., Kolb, B. Compiladores. New York: Oxford University Press.
- Brenes, J.; Rodríguez, O. & Fornaguera, J. (2008) Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 89, n.1, p. 85-93
- Calil, C. & Marcondes, F. (2006) The comparison of immobility time in experimental rat swimming models. *Life Sciences*, v. 79, p. 1712-1719.
- Cardenas, F.; Lamprea, M. & Morato, S. (2001) Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behaviour in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, v. 122, n. 2, p. 169-174
- Carobrez, A. & Bertoglio, J. (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 29, n. 8, p. 1193-1205

- Cryan, J.; Valentino, R. & Lucki, I. (2005a) Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 29, n. 4-5, p. 547-569
- Cryan, J.; Page, M. & Lucki, I. (2005b) Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *European Journal of Pharmacology*, v. 436, n. 3, p. 197-205.
- De Pablo, J.; Parra, A.; Segovia, S. & Guillamón, A. (1989) Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. *Physiology & Behavior*, v. 46, n. 2, p. 229-237.
- Detke, M.; Rickels, M. & Lucki, I. (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, v. 121, n. 1, p. 66-72.
- Dyck, R (2005). Vibrissae. En *The behaviour of the laboratory rat. A handbook with tests*. Wishaw, I., Kolb, B. Compiladores. New York: Oxford University Press.
- Ennaceur, A.; Michilikova, S. & Chazot, P (2006). Models of anxiety: Responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. *Behavioural Brain Research*, v. 171, n. 1, p. 26-49
- Gonzalez, M. & Aston-Jones, G. (2008) Light deprivation damages monoamine neurons and produces a depressive behavioral phenotype in rats. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 105, n. 12, p. 4898-4903.
- Guimãraes, F.; Joca, S.; Padovan, C. & Molina, V. (2006) Mood disorders. En Brandão, M. & Graeff, F. (editores). *Neurobiology of mental disorders* (p. 95-124). New York: Nova Science.
- Hall, C. (1934) Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 18, n. 3, p. 385-403
- Kalueff, A.; Wheaton, M. & Murphy, D. (2007) What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modelling of anxiety and depression. *Behavioural Brain Research*, n. 179, p. 1-18.
- Lino-de-Oliveira, C.; De Lima, T. & Carobrez, A. (2005) Structure of the rat behavior in the Forced Swimming Test. *Behavioural Brain Research*, v. 158, n. 2, p. 243-250.
- Lister, R. (1990) Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 46, n. 3, p. 321-340.
- Matthews, K.; Christmas, D.; Swan, J. & Sorrell, E. (2005) Animal models of depression: navigating through the clinical fog. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 29, n. 4-5, p. 503-513
- McKay, M. & Zakzanis, K. (2009) The impact of treatment in HPA axis activity in unipolar major depression. *Journal of Psychiatry Research*, en prensa.
- Murray, C. & Lopez, A. (1997) Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, n 349, p. 1269-76
- Nestler, E.; Gould, E. & Manji, H. (2002) Preclinical models: status of basic research in depression. *Biological Psychiatry*, v. 52, n. 6, p. 503-528
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. & Briley, M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, n. 3, p. 149-167
- Porsolt, R.; Anton, G. ; Blavet, N. & Jalfre, M. (1978) Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*, v. 47, n. 4, p. 379-391.
- Richardson, J. (1990) Animal models of depression reflect changing views on the essence and etiology of depressive disorders in humans. *Progress in neuro-psychopharmacology and biologic psychiatry*, v 15, p. 199-204.
- Rodgers, R.; Haller, A.; Halasz, T. & Brain, P. (1999) Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology & Behavior*, v. 68, n. 1-2, p. 47-53
- Sher, L.; Oquendo, M. & Mann, J. (2001) Risk of suicide in mood disorders. *Clinical Neuroscience Research*, v. 1, n. 5, p. 337-344.
- Sun, M. & Alkon, D. (2003) Open space swimming test to index antidepressant activity. *Journal of neuroscience methods*, n. 126, p.35-40.
- Wall, P. & Messier, C. (2001) Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 25, n. 3, p. 275-286

### Gráficos

Figura N° 1. Media  $\pm$  error estandar de la media (E.E.M) de emisión de bolos fecales durante los 4 días de exposición al aparato en función de la condición de exposición: PE: plataforma elevada; PC: plataforma cerrada. \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos para cada día de ensayo; + indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) intra grupo con respecto al día anterior.

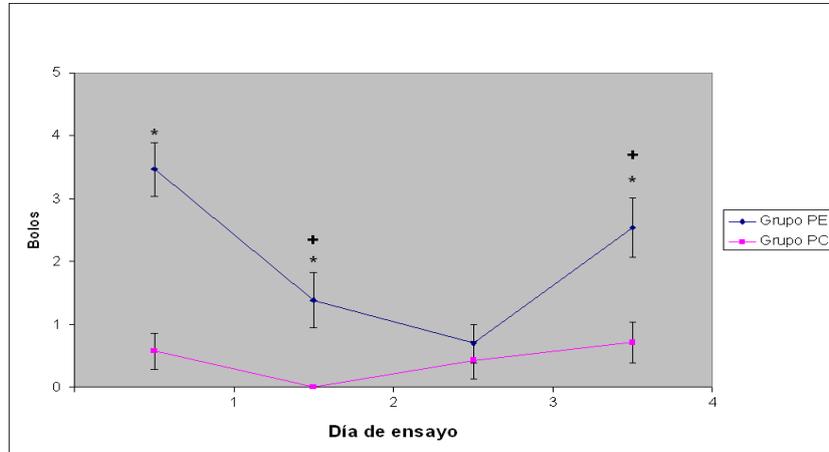


Figura N° 2. Media  $\pm$  E.E.M. de duración total de escalada, para los tres grupos y en ambas versiones del TNF. \* indica efectos significativos ( $p < 0,05$ ) de versión del TNF.

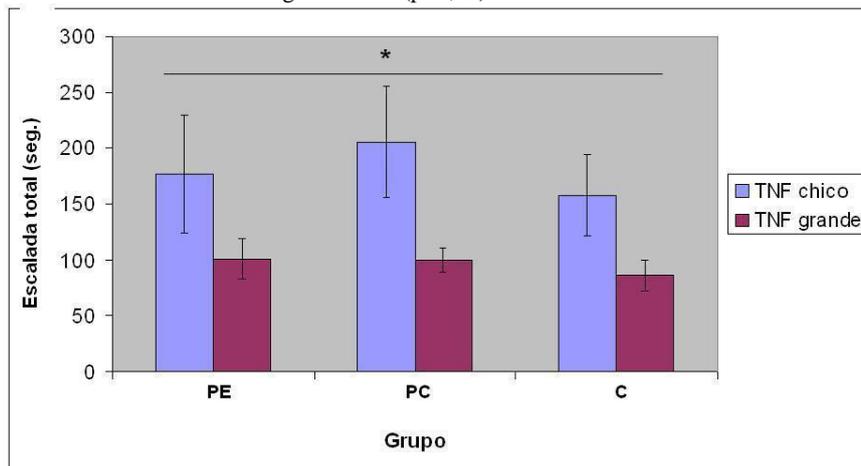


Figura N° 3. Media  $\pm$  E.E.M. de duración total de natación, para los tres grupos y en ambas versiones del TNF. \* indica un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) de versión del TNF.

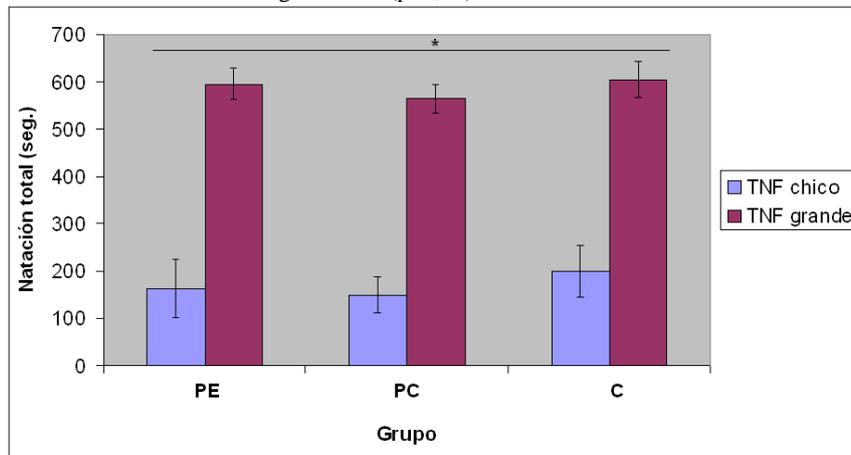


Figura N° 4. Media  $\pm$  E.E.M. de duración total de buceo, para los tres grupos y en ambas versiones del TNF. \* indica un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) de versión del TNF, # indica que la duración total de buceo fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) para este grupo.

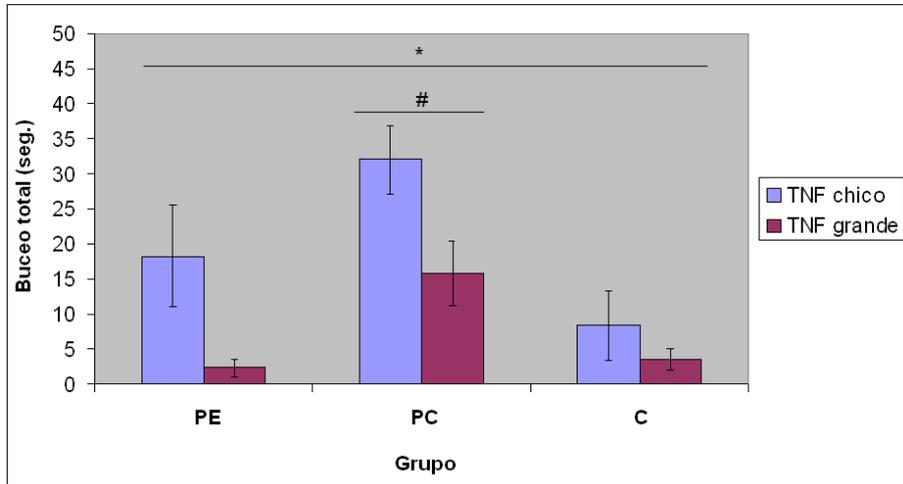


Figura N° 5. Media  $\pm$  E.E.M en la duración total de inmovilidad. \* indica un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) de versión del TNF.

